

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

PUBLIÉES PAR

LA DIRECTION DE L'INSTITUT PASTEUR

Avec le concours des Chefs de Service
et des Chefs de Laboratoire

Secrétaire général : P. LÉPINE



MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

Libraires de l'Académie de Médecine

120, Boulevard Saint-Germain

PARIS

SOMMAIRE DU N° 2

	Pages
Formation et propriétés de la fonction-anticorps correspondant aux molécules organiques de faible poids moléculaire, par J. LOISELEUR (avec l'assistance de M ^{lle} M. SAUVAGE).	157
Mode de multiplication du bacille de Koch. Morphologie du bacille et de ses colonies, quelques sources d'erreurs, par JEVREM NEDELKOVITCH.	1
Études sur le collagène. — IV. Évaluation de l'activité collagénasique de la toxine <i>perfringens</i> , par MAYLIS GUILLAUMIE, Slava MRCEVITCH, Marcelle DELAUNAY et G. BECOULET.	19
Détermination du titre anti-collagénasique des sérums anti- <i>perfringens</i> , par MAYLIS GUILLAUMIE, Slava MRCEVITCH, Marcelle DELAUNAY et G. BECOULET.	20
Milieux semi-synthétiques à l'albumine pour la culture des bacilles tuberculeux, par René DUBOS et Henriette NOUFFLARD.	20
Le distillat d'huile de foie de morue. Propriétés antibiotiques et premières applications thérapeutiques, par J. SOLOMIDÈS.	22
De quelques recherches consacrées au virus de la maladie de Newcastle en Tunisie, par Georgette CORDIER, Jean CLAVIERAS et Aziz OUNAIS.	24
L'action antimétachromatique de la streptomycine, par W. MUTSAARS et L. LISON.	26
Société française de microbiologie (<i>Sommaire page 4 de la couverture</i>)	27

Œuvres de Pasteur réunies par PASTEUR VALLERY-RADOT, tome VII « Mélanges scientifiques et littéraires. Index analytique de l'œuvre de Pasteur ». Un vol. gr. in-8° de 666 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939.

Albert Calmette. Sa vie. Son œuvre scientifique, par P. NOËL BERNARD et LÉOPOLD NÈGRE. *Préface de Pasteur Vallery-Radot. Avant-propos de A. Yersin.* Un vol. de 274 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939.

J. BORDET. — Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses. Deuxième édition. Un volume de 880 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939.

ANDRÉ-R. PRÉVOT. — Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies. Un volume in-8° de 290 pages, 2^e édition (*Monographie de l'Institut Pasteur*), Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1948.

MARGUERITE LWOFF. — Recherches sur le pouvoir de synthèse des flagellés trypanosomides. Un vol. de 244 pages (*Monographie de l'Institut Pasteur*). Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1941.

EDM. SERGENT, A. DONATIEN, L. PARROT et F. LESTOQUARD (in memoriam). — Étude sur les piropasmoses bovines. Un vol. in-16 de 816 pages, 325 illustrations, 1945 (*Institut Pasteur, Alger*).

N. B. — Le paiement est accepté en toutes monnaies étrangères au cours du dollar au moment du règlement.

PRIX DE L'ABONNEMENT POUR 1950

France et Union Française Fr. 2.000
(Règlement par mandat, chèques postaux [Compte n° 599 Paris]
ou chèque bancaire.)

Belgique et Luxembourg Fr. B. 375

Autres pays \$ U. S. A. 7,5

Prix également payables dans les autres monnaies
au cours des règlements commerciaux le jour du paiement.
(Règlement par Banque Nationale.)

Changement d'adresse : 20 fr.

Secrétariat, 25, rue du Docteur-Roux, Paris (XV^e).

Publication mensuelle.

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

FORMATION ET PROPRIÉTÉS DE LA FONCTION-ANTICORPS CORRESPONDANT AUX MOLÉCULES ORGANIQUES DE FAIBLE POIDS MOLÉCULAIRE

(Suite.)

par J. LOISELEUR

(avec l'assistance de M^{lle} M. SAUVAGE).

(Institut Pasteur, Service de Chimie-Physique.)

XI. — Facteurs physico-chimiques de la formation de l'anticorps.

L'ensemble des faits expérimentaux qui viennent d'être exposés met en évidence certains des phénomènes physico-chimiques dont dépend la formation de l'anticorps.

DIFFUSION DE L'ANTIGÈNE ET CHRONOLOGIE DE L'EXPÉRIENCE. — Le premier facteur, qui intervient constamment dès le début de la préparation de l'animal, est la diffusibilité de l'antigène, facteur essentiel, qui commande à la fois son mode d'administration et la date d'apparition de l'anticorps.

D'autre part, les différents tests (épreuve de viscosité et floculation) étant de sensibilités différentes, ne deviennent positifs qu'à des stades successifs de la préparation de l'animal. La possibilité de s'accoler sur l'antigène est la première manifestation de la présence de l'anticorps. La floculation qui s'observe à un stade ultérieur semble exiger un degré de préparation plus mar-

qué. Nous retrouvons ici, avec les antigènes de faible poids moléculaire, une séquence analogue à celle que l'on observe avec des antigènes protéidiques (1) : quand on prépare un lapin avec des pseudo-globulines de cheval, on obtient, dès la première injection, un test de viscosité positif, mais d'une façon peu marquée et ne persistant que pendant une très courte période. Au cours des injections successives d'antigène, ce test s'amplifie en valeur et en durée : ce n'est que lorsqu'il a atteint sa valeur maximum que la floculation apparaît.

INFLUENCE DE LA FONCTION CHIMIQUE DE L'ANTIGÈNE. — On pouvait s'attendre à ce que l'expérimentation avec des molécules pures, bien définies, permette de caractériser un pouvoir antigène relatif à chaque fonction chimique.

L'expérience conduit à un résultat inattendu. La seule condition fondamentale imposée à l'antigène est la solubilité dans l'eau. Mais le rôle de son groupement chimique ne semble intervenir que dans la qualité de l'anticorps. Examinons successivement à ce point les tests de viscosité et la floculation.

Des lapins, du même âge et d'un poids comparable (1,8 à 2,1 kg.), sont préparés pendant treize jours avec des doses équivalentes (0,05 M) de différentes molécules. Le tableau XVI reproduit l'ensemble des résultats :

TABEAU XVI. — Relation entre la nature chimique et le pouvoir antigénique.

Lapins préparés pendant 13 jours par 0,05 M d'antigène
(prise de sang 4 jours après la cessation du traitement).

ANTIGÈNE	POURCENTAGE de la variation de viscosité
Ethanol	9,5
Xylose	7,2
Acétate Na	11,7
Tartrate Na	11,5
Salicylate Na	8,8
dl-alanine	7,4
dl-phénylalanine	7,5

On constate que ces valeurs sont bien voisines, surtout si l'on tient compte du facteur individuel des animaux.

L'intervention des fonctions chimiques de l'antigène ne se manifeste d'une façon nette que pour le pouvoir floculant des molécules de la série grasse : la superposition de plusieurs groupes tels qu'un groupe — OH ou — NH₂ surajouté à une

(1) J. LOISELEUR, J. J. PÉREZ et M^{lle} C. SERGENT, *Ces Annales*, 1946, 72, 843.

fonction acide, entraîne la diminution ou même la disparition des propriétés floculantes.

INFLUENCE DU VOLUME MOLÉCULAIRE DE L'ANTIGÈNE. — Par contre, *le caractère essentiel qui se dégage de l'ensemble des expériences est, non pas l'importance de la nature des fonctions chimiques, mais celle du poids moléculaire, c'est-à-dire du volume moléculaire.* Ce fait expérimental est indiscutable et est confirmé à la fois par les mesures de viscosité et par l'observation des floculations : comme on l'a déjà souligné, un antigène produit un anticorps doué de propriétés floculantes d'autant plus accusées que sa taille est plus grande. Si l'on compare deux groupes d'antigènes de poids moléculaires très différents : d'une part l'éthanol, le xylose, l'acétate de Na, d'autre part le doisyolate de Na, la streptomycine, le raffinose, on constate que ce dernier groupe entraîne la formation d'anticorps doués des propriétés floculantes les plus marquées.

TAUX DE L'ANTICORPS. SA LIMITE. — Tant que les quantités d'antigène restent faibles, le taux de l'anticorps est très sensiblement proportionnel à la dose d'antigène. Fait important : *dès que la dose d'antigène augmente, le taux de l'anticorps atteint rapidement une limite supérieure qui ne peut être dépassée, quelque grande que soit la dose d'antigène et quelque prolongée que soit la durée du traitement.* Le seul effet d'une préparation excessive est la diminution de la spécificité. *Tout se passe comme si le sang renfermait une sorte d'anticorps préexistant, dont le taux resterait limité.* Le tableau XVII permet de comparer l'effet produit par des préparations avec des doses variées d'un même antigène :

TABEAU XVII. — Relations entre les taux de l'antigène et de l'anticorps.

ANTIGÈNE	POIDS TOTAL injecté (en grammes)	DURÉE de la préparation (en jours)	HAUTEUR du maximum
Éthanol	2,9	13	9,5
	112	20	14,8
Salicylate Na.	8,9	13	8,7
	12,6	20	15,7

RAPPORTS MOLÉCULAIRES ENTRE L'ANTIGÈNE ET L'ANTICORPS. --- Malgré la dose apparemment considérable d'antigène exigée pour la préparation de l'animal, la comparaison entre ce poids d'anti-

gène et le poids d'antigène susceptible d'être fixé par l'anticorps révèle une disproportion comparable à celle des antigènes protéïdiques et s'opposant, pour l'anticorps, à toute filiation directe avec l'antigène.

Prenons, par exemple, le cas général d'un lapin pesant 2 kg., préparé pendant douze jours par 10 g. au total d'un antigène de poids moléculaire égal à 100 et supposons que le sérum se combine à la fin de la préparation avec 0,5 mg. de l'antigène (au maximum de la zone d'équivalence). Comme nous savons que l'anticorps reste localisé dans la γ -globuline, nous allons considérer principalement cette dernière en admettant, pour le moment, que la γ -globuline, qui va être le support de l'anticorps, est également intéressée par l'action de l'antigène au cours de la préparation de l'animal. Cette dernière hypothèse est sans importance sur la validité du raisonnement, puisque la γ -globuline est prise comme modèle et que les faits ne changeraient nullement si cette γ -globuline était remplacée par une molécule quelconque (appartenant au système réticulo-endothélial ou autre). La seule chose que nous sachions est qu'au début de la préparation, la molécule sur laquelle agit l'antigène est une molécule constitutive normale de l'organisme.

1° Considérons d'abord le rapport des masses moléculaires de l'antigène et de la γ -globuline au cours de la préparation.

La quantité d'antigène qui agit efficacement est celle qui persiste réellement dans la circulation. Un chiffre moyen ne peut être qu'arbitraire. En se basant sur les courbes d'élimination obtenues avec le saccharose, la streptomycine ou la pénicilline, on peut admettre que le taux de l'antigène a diminué d'environ 50 p. 100 après une heure : ce chiffre est trop élevé pour l'acétate de Na, trop faible pour l'éthanol.

Finalement, on peut admettre que l'animal subit de façon continue l'action de l'antigène, comme si une partie aliquote était injectée régulièrement toutes les heures.

La quantité constamment active de l'antigène est ainsi égale à :

$$\frac{10 \text{ g.}}{12 \text{ jours} \times 24 \text{ heures}} = 34 \text{ mg.}$$

En admettant que la masse sanguine représente le 1/13 du poids de l'animal, elle atteint ici 160 g., ce qui représente environ 2 g. de globulines. Finalement, ces 2 g. de globulines subissent l'action continue de 34 mg. d'antigène.

2° Calculons maintenant le poids d'antigène auquel ces 2 g. de globulines-anticorps sont susceptibles de se combiner dans la zone d'équivalence.

Puisque nous avons admis que, chez l'animal préparé, 1 cm³ de γ -globuline (ou de sérum) se combine à 0,5 mg. d'antigène,

la totalité du sang, c'est-à-dire les 2 g. de globulines, se combinent à $160 \times 0,5 = 80$ mg.

Malgré son caractère très approximatif, ce calcul montre que *l'anticorps sature un nombre de molécules d'antigène de beaucoup supérieur à celui qui agit sur les globulines* (ou sur toute autre molécule génératrice de l'anticorps au cours de la préparation de l'animal). Nous retrouvons ici ce fait bien connu pour les antigènes protéidiques : la disproportion entre le poids d'antigène utilisé dans la préparation et celui qui se combine à l'anticorps.

Il en résulte que toute hypothèse sur la formation de l'anticorps doit, par suite de cette disproportion entre le poids d'antigène utilisé et le poids d'anticorps formé, écarter toute filiation directe de l'antigène à l'anticorps. *Cette disproportion est, au contraire, l'indice d'un phénomène catalytique, dans lequel la masse des produits formés reste indépendante du poids du catalyseur et où l'antigène n'intervient que par sa seule présence.*

La nature d'un tel phénomène va encore se préciser en considérant la vitesse de formation de l'anticorps.

XII. — Vitesse de formation de l'anticorps.

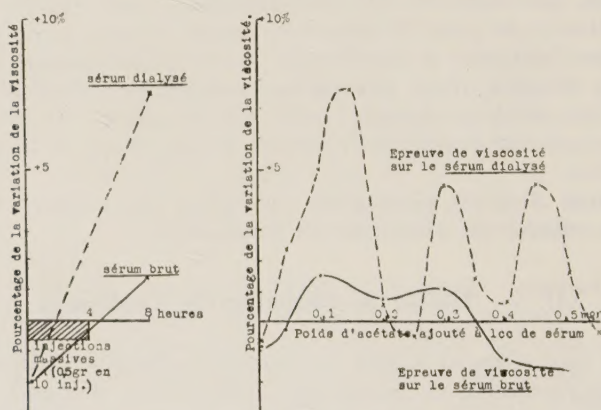
Il faut tout d'abord établir la distinction fondamentale entre la *vitesse de formation* de l'anticorps et sa *vitesse d'apparition*. En effet, l'anticorps ne peut manifester sa présence que quand l'antigène introduit en excès dans l'organisme a été éliminé, moment qui se situe, en général, entre les deuxième et quatrième jours consécutifs à la dernière injection préparante. Quand la préparation est prolongée pendant plusieurs jours, il est impossible de situer la date où a débuté la formation de l'anticorps.

La technique par préparation massive, dans laquelle une dizaine d'injections sont pratiquées pendant une période de trois à cinq heures, permet au contraire de faire exactement cette distinction entre les vitesses de formation et d'apparition de l'anticorps. Le problème se situe de la façon suivante. Dans les conditions expérimentales normales, l'animal est préparé le premier jour pendant trois à cinq heures et laissé au repos pendant quarante-huit heures ; la prise de sang, pratiquée le troisième jour, révèle la présence de l'anticorps. *La question est de savoir si cette période de trois jours est nécessaire à la formation de l'anticorps, laquelle serait alors lente et complexe, ou bien si l'anticorps a été formé pendant la durée même des injections, la période de repos correspondant seulement au temps nécessaire à l'élimination de l'antigène.*

Or, la nature particulière de ces antigènes de faible poids

moléculaire permet de répondre à cette question par une expérience très simple qui repose sur les facteurs suivants. Tout d'abord la combinaison de l'anticorps et de l'antigène s'effectue seulement du côté alcalin du point isoélectrique et l'acidification libère l'antigène. D'autre part, l'antigène est diffusible et facilement dialysable. Par conséquent, si l'anticorps a été formé au cours même de la durée des injections, il suffit de prélever le sang dès la fin des injections et de dialyser le sérum en milieu acide pour éliminer l'antigène ; en revenant à $\text{pH} = 7,4$, l'anticorps

LAPIN PRÉPARÉ PAR INJECTIONS MASSIVES D'ACÉTATE DE SODIUM



Courbe LIV.

VITESSE DE FORMATION DE L'ANTICORPS.
DIALYSE DU SÉRUM « IN VITRO ».

L'animal subit pendant quatre heures une préparation massive par 10 injections d'acétate de Na. Le sérum, prélevé après un repos de quatre heures, est divisé en deux fractions : l'une sert au test de viscosité et donne un résultat à peine sensible ; l'autre est dialysé pendant trois jours à $\text{pH} = 3$, puis ramené à $\text{pH} = 7,4$. Le résultat de l'épreuve de viscosité est alors considérablement augmenté.

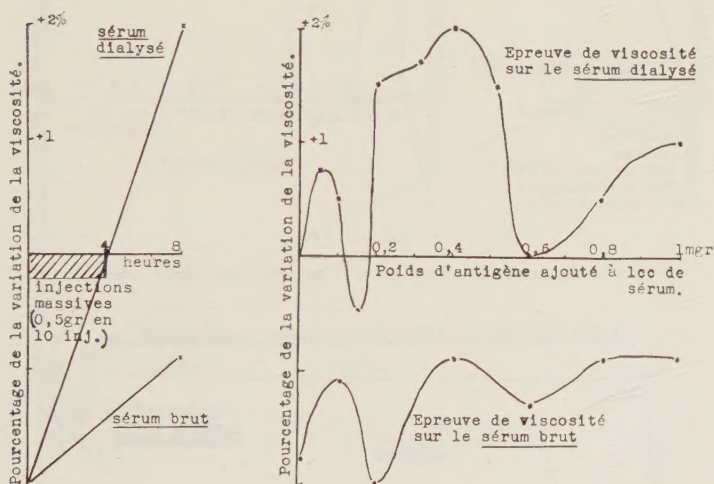
libéré doit manifester sa présence aussi bien que dans le sérum prélevé après un délai de deux à trois jours. Autrement dit, la dialyse *in vitro* en milieu acide doit alors avoir la même action que l'élimination *in vivo*.

EXPÉRIENCE AVEC LE SÉRUM TOTAL. — Un lapin est préparé pendant quatre heures par 0,5 g. d'acétate de Na, administré en dix injections. Le sérum, prélevé quatre heures après la fin du traitement, est divisé en deux parties. L'une sert directement à l'épreuve de viscosité (courbe LIV) et ne donne qu'un résultat très faible. L'autre, portée à $\text{pH} = 3$, est dialysée, pendant

quatre jours, sur une solution de HCl $\frac{\text{N}}{5.000}$ additionnée de 7 p. 1.000 de NaCl . On renouvelle tous les jours cette solution. Le quatrième jour, on ramène le pH à 7,4 et on ajuste les concentrations : le résultat de l'épreuve de viscosité est alors considérablement amplifié.

Par conséquent, l'anticorps est déjà formé quatre heures après la fin du traitement massif et la faible intensité de la réaction sur

LAPIN PRÉPARÉ PAR INJECTIONS MASSIVES DE BENZOATE DE SODIUM



Courbe LV.

VITESSE DE FORMATION DE L'ANTICORPS.
DIALYSE DU SÉRUM « IN VITRO ».

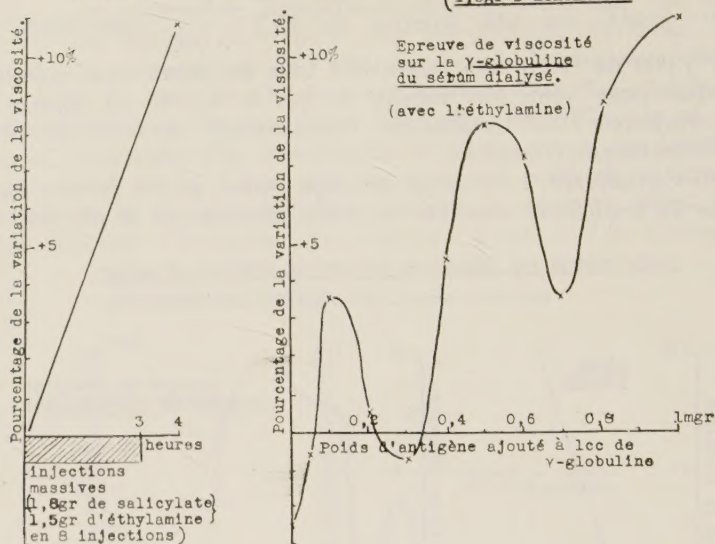
Un lapin subit, pendant quatre heures, une préparation massive par 10 injections de salicylate de Na (0,5 g.). Le sérum, prélevé quatre heures après, est divisé en deux parties : l'une sert à l'épreuve de viscosité (résultat négatif) ; l'autre, dialysée pendant trois jours à pH = 3, puis ramenée à pH = 7,4, donne un résultat positif.

le sérum brut est la conséquence de la persistance de l'antigène.

Le résultat est encore plus net si l'on répète la même expérience avec le benzoate de Na, sel beaucoup moins diffusible que l'acétate de Na. L'essai du sérum brut est alors totalement négatif (courbe LV), ce qui fait encore mieux ressortir l'action de la dialyse.

EXPÉRIENCES AVEC LA γ -GLOBULINE. — L'expérience donne un résultat identique en opérant avec la γ -globuline. On commence par

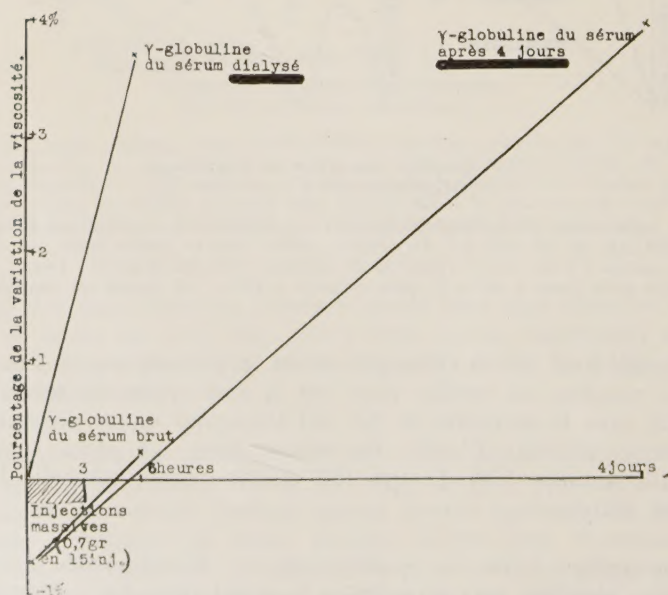
LAPIN PRÉPARÉ PAR INJECTIONS MASSIVES { 1,8gr DE SALICYLATE DE Na
1,5gr D'ÉTHYLAMINE



Courbe LVI.

PRÉPARATION PAR L'INJECTION MASSIVE DE DEUX ANTIGÈNES SIMULTANÉS.

LAPIN PRÉPARÉ PAR INJECTIONS MASSIVES D'ACÉTATE DE Na



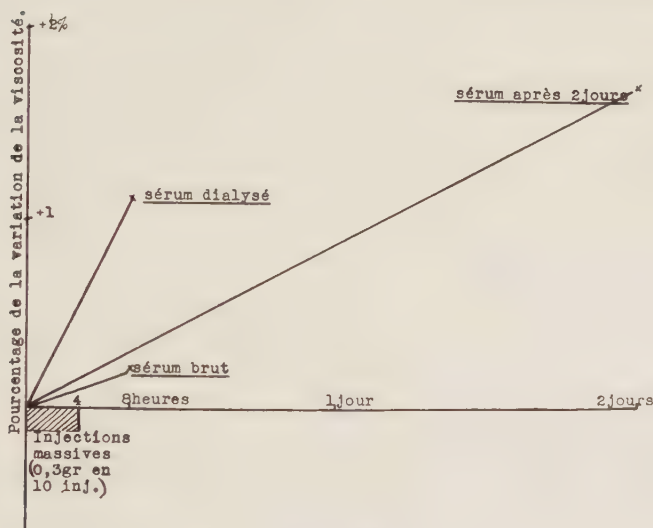
Courbe LVII.

(Voir la légende à la courbe LVIII.)

dialyser le sérum total en milieu acide ($\text{HCl } \frac{\text{N}}{5.000} + \text{NaCl } 7 \text{ p. 1.000}$). On revient à $\text{pH} = 7,4$ à la fin de la dialyse et on traite, à ce moment, par le sulfate d'ammonium pour isoler la γ -globuline.

Remarquons d'abord que l'expérience donne le même résultat positif si l'on opère avec deux antigènes, tels qu'un mélange d'éthylamine et de salicylate de Na. La courbe LVI reproduit

LAPIN PRÉPARÉ PAR INJECTIONS MASSIVES DE SALICYLATE DE SODIUM



Courbe LVIII.

VITESSE DE FORMATION DE L'ANTICORPS.
DIALYSE DU SÉRUM « IN VITRO ».

Un lapin subit, pendant trois heures, une préparation massive, soit par l'acétate de Na (courbe LVII), soit par le salicylate de Na (courbe LVIII). Le sang est prélevé : 1° immédiatement après l'injection, après un repos de trois heures ; 2° quatre jours après. Les γ -globulines correspondantes sont inactives le premier jour, mais actives le quatrième jour. Cette différence tient son origine à la seule persistance de l'anticorps au premier jour, puisque la même γ -globuline (du premier jour, inactive à l'état brut), devient active après dialyse à $\text{pH} = 3$.

le résultat obtenu sur la γ -globuline (en éprouvant avec l'éthylamine seulement).

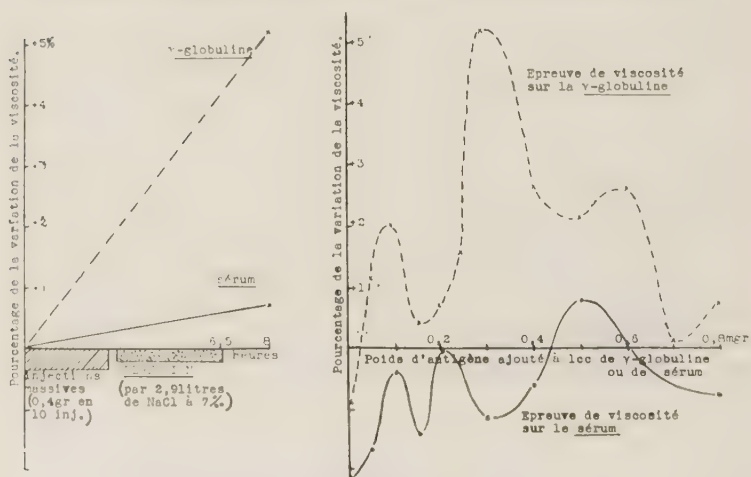
L'importance des prises de sang qui doivent être effectuées dans un délai très court rend difficile la réussite d'une expérience totale. Il faut en effet éprouver l'animal avant l'expérience, prélever, à la fin du traitement massif, une quantité de sang suffisante pour étudier les γ -globulines du sérum brut et du sérum

dialysé et enfin, après un repos de quatre jours, faire un nouveau prélèvement de façon à comparer les résultats précédents avec la γ -globuline correspondant à l'élimination normale de l'antigène.

La courbe LVII est relative à un animal préparé par l'acétate de Na. Quatre heures après la fin du traitement, la dialyse fait apparaître l'anticorps et il est à remarquer que ce taux est sensiblement identique à celui qui apparaît le quatrième jour dans la γ -globuline de l'animal laissé au repos. La courbe LVIII reproduit une expérience analogue, mais avec le salicylate de Na.

PERFUSION DE L'ANIMAL. — On peut tout aussi bien provoquer l'élimination de l'antigène en activant, par la perfusion, les

LAPIN PRÉPARÉ PAR INJECTIONS MASSIVES DE SALICYLATE DE SODIUM, COURBES DE PERFUSION



Courbe LIX.

VITESSE DE FORMATION DE L'ANTICORPS.
PERFUSION DE L'ANIMAL.

L'animal est préparé, pendant trois heures, par 10 injections de salicylate de sodium. Immédiatement après ce traitement, l'animal subit une perfusion par 3 litres de sérum physiologique. Deux heures après, on constate la présence de l'anticorps dans le sérum total et dans la γ -globuline.

échanges dans le corps même de l'animal : par rapport à la dialyse de l'expérience précédente, c'est une sorte de variante où la dialyse est effectuée *in vivo*. Un lapin est préparé, pendant trois heures, de 9 à 12 heures, par injections massives de salicylate de Na. Immédiatement après, l'animal subit une perfusion avec une solution de NaCl à 7 p. 1.000, à l'aide d'un trocard introduit dans les muscles de la cuisse. Le réservoir de la solu-

tion salée est placé à 1 mètre au-dessus de l'animal, de façon que la pression du liquide soit suffisante. L'opération est poursuivie pendant trois heures trente. Une heure trente après, on prélève le sang. On constate (courbe LIX) la présence de l'anticorps dans le sérum total et surtout dans la γ -globuline. L'expérience est faussée par l'arrêt de l'élimination urinaire de l'animal, pendant le cours de l'expérience. Le liquide perfusé s'accumule dans le corps de l'animal qui pèse plus de 5 kg. à la fin de l'expérience. Cette masse de liquide a néanmoins entraîné une élimination de l'antigène suffisante pour faire apparaître l'anticorps.

L'ensemble de ces expériences peut être résumé par le tableau XVIII :

TABLEAU XVIII. — Vitesse de formation de l'anticorps.

		PRÉSENCE de l'anticorps
Premier jour, 9 à 12 heures, préparation massive.	Sérum brut. Sérum dialysé.	Négative. Positive.
Troisième et quatrième jour.	Sérum brut.	Positive.

Il en résulte que, dans une première étape, l'anticorps est formé, au cours même de l'envahissement de l'organisme, par l'antigène. c'est-à-dire avec une vitesse qui exclut toute intervention de l'antigène lors de la synthèse des globulines.

XIII. — Mode de formation de l'anticorps.

Les différentes caractéristiques que l'expérience vient de mettre en évidence limitent le choix des hypothèses sur l'origine et le mode de formation de ces anticorps. Rappelons ces caractéristiques :

1° la solubilité de l'antigène dans l'eau, propriété plus importante que la nature particulière de ses fonctions chimiques ;

2° l'importance de la taille de l'antigène, c'est-à-dire du volume qu'il occupe dans l'espace ;

3° l'intervention de la structure moléculaire de l'antigène (spécificité des isomères optiques) ;

4° la nécessité, pour la préparation de l'animal, d'une dose élevée d'antigène. c'est-à-dire d'un envahissement brutal de l'organisme. La dose massive, imposée pendant quelques heures, a plus d'effet qu'une dose faible, administrée pendant une longue période ;

5° la localisation de l'anticorps dans la γ -globuline, c'est-à-dire dans celui des constituants plasmatiques qui possède le poids moléculaire le plus grand, c'est-à-dire, en même temps, la plus faible énergie potentielle ;

6° la spécificité, souvent étroite, de l'anticorps ;

7° l'action exercée par les injections de rappel ;

8° la possibilité de préparer le même animal avec des antigènes multiples, simultanés ou successifs, témoignant à la fois de l'automatisme de la formation de l'anticorps et de sa malléabilité ;

9° la disproportion entre le poids de l'antigène injecté et le taux de l'anticorps formé ;

10° la rapidité de la formation de l'anticorps.

Il ressort de ce tableau, d'une part, pour l'antigène, l'intervention prépondérante de ses propriétés physiques (solubilité dans l'eau, structure externe, taille et éléments de symétrie) et, d'autre part, pour l'anticorps, le caractère semi-automatique de sa formation, toujours localisée sur la γ -globuline. Avant d'aborder le mode de formation de l'anticorps, il convient de considérer la structure du plasma.

STRUCTURE DU PLASMA NORMAL. — Le plasma sanguin constitue, comme on le sait, un milieu anormal dans toutes ses propriétés physiques. La valeur de sa viscosité, par exemple, est très faible, et même beaucoup plus faible que celle de chacun de ses constituants protéidiques considérés isolément. Ces propriétés impliquent pour le plasma l'existence d'une structure liquide très étroite. L'allure des variations de l'indice réfractométrique du sérum en fonction de sa dilution a même conduit Jonnard (2) à adopter une conception moléculaire de cette structure. Autrement dit, il existe, pour tous les constituants sériques, un arrangement défini : la distribution respective des globulines, de l'albumine, des lipides, des sucres, etc., n'est pas désordonnée, mais correspond à une structure stricte où chaque constituant occupe une place définie.

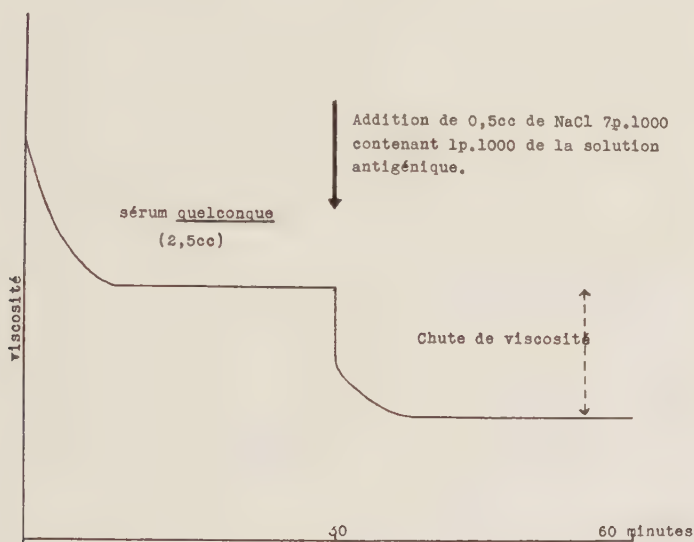
DÉFINITION DE L'ANTICORPS COMME UNE ORGANISATION SPÉCIFIQUE DU PLASMA. — Si une molécule étrangère pénètre dans un tel assemblage, cette molécule ne trouve à occuper aucune place définie. C'est bien ce que traduit littéralement la chute constante de la courbe de viscosité (courbe LX), chute qui se produit quand on introduit une molécule organique *quelconque* dans un sérum *quelconque*. Cette chute de la viscosité, qui reste du même ordre de grandeur que celle qu'entraînerait la simple dilution par une solution de NaCl à 7 p. 1.000, montre que la molécule organique

(2) R. JONNARD, C. R. Soc. Biol., 1936, **121**, 341 et **122**, 48.

introduite dans le sérum s'y disperse sans ordre et sans interaction avec les éléments constitutifs du sérum.

Au contraire, s'il s'agit d'un sérum préparé et de son antigène spécifique, on constate (courbe LXI), dans la zone d'équivalence, l'augmentation de la viscosité : donc la distribution de l'antigène parmi les molécules sériques, ne se fait plus au hasard, mais est ordonnée ; autrement dit, l'antigène trouve désormais une place *définie* parmi les constituants sériques normaux.

Le rapprochement de ces deux courbes (LX et LXI) montre



Courbe LX.

(Voir légende page suivante.)

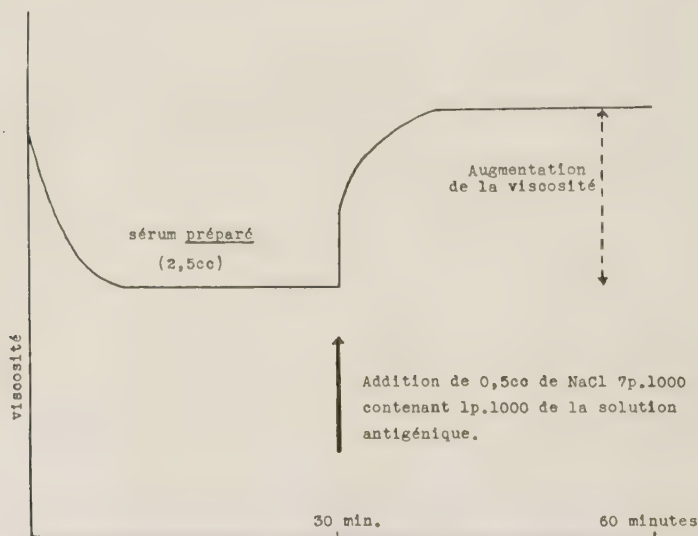
que la préparation de l'animal — c'est-à-dire la présence imposée de l'antigène dans la circulation — a entraîné une sorte d'adaptation exacte de la structure du plasma à la présence de la nouvelle molécule, laquelle pourra désormais figurer dans le plasma au même titre que ses constituants normaux.

APPARITION DE LA FONCTION-ANTICORPS. — On remarquera que jusqu'ici nous sommes resté rigoureusement dans le domaine des faits expérimentaux. L'intervention de l'hypothèse est seulement nécessaire pour expliquer comment peut se faire cette réorganisation spécifique du plasma.

Considérons d'abord, sur un protéide quelconque en solution

pure, la répartition spatiale des groupes dissociés. Chacun d'eux définit la présence d'une charge ponctuelle (positive ou négative). Plusieurs facteurs (angles de valence, nécessités stériques) interviennent pour assigner à chacune de ces charges une position caractéristique. Mais il ne s'agit là que d'une position *moyenne* autour de laquelle le groupe considéré subit des déplacements incessants (rotation et vibration). Il en résulte, pour la molécule, un certain degré de malléabilité et une aptitude à répondre aux influences extérieures, par des remaniements secondaires.

Si nous introduisons maintenant dans cette solution une nou-



Courbe LXI.

Courbe LX. Chute de la viscosité, consécutivement à l'addition d'une molécule quelconque à un sérum quelconque : la molécule se disperse au hasard.

Courbe LXI. Augmentation de la viscosité, consécutivement à l'addition de l'antigène au sérum préparé spécifiquement : la distribution de l'antigène parmi les molécules sériques est ordonnée.

velle molécule — qui sera l'antigène —, trois éventualités sont possibles pour les charges électriques du protéide : a) les groupes dissociés de signe opposé à ceux de l'antigène entraînent la combinaison polaire, quelques-uns — et nécessairement l'un des groupes, au moins, remplit cette condition — étant placés d'emblée dans le rayon d'action moléculaire (4 à 5 Å), d'autres devenant susceptibles de remplir cette condition au cours des vibrations que nous avons envisagées précédemment ; b) les groupes de même signe sont antagonistes à la

combinaison ; c) une partie importante des groupes, placés en dehors du rayon d'action moléculaire, reste indifférente.

Le mélange des deux molécules se trouve ainsi soumis à un ensemble d'attraction (groupes favorables) et de répulsion (groupes antagonistes), si bien qu'à l'état statique aucune modification ne se produit. Mais, si une contrainte extérieure intervient, le système évolue vers le minimum d'énergie potentielle, en augmentant donc les groupes favorables par une orientation particulière des groupes (a) et en éliminant les groupes antagonistes (b) qui s'effacent en occupant une position permise par leur vibration. Il en résulte l'adaptation spécifique du protéide à la molécule étrangère. Cette adaptation spécifique constitue l'anticorps ou, plus exactement, une *fonction-anticorps* qui apparaît, non comme une dénaturation, mais comme une stabilisation sur un point d'équilibre, indifférent parmi toutes les positions possibles, mais adapté spécifiquement à la structure de l'antigène.

Pour appliquer un tel mécanisme au plasma, la seule part de l'hypothèse revient à admettre que cette déformation spécifique concerne les γ -globulines qui sont les molécules les plus lourdes et, de ce fait, les moins stables. Cette fonction-anticorps apparaît ainsi sur une molécule pré-existante, tandis que l'anticorps, considéré comme une molécule néo-formée, constitue une entité. Une telle fonction-anticorps peut s'adapter indéfiniment à une succession d'antigènes différents, chaque nouvelle structure « effaçant » la précédente. *La fonction-anticorps résulte initialement donc à la fois de l'organisation structurale des constituants plasmatiques normaux et de l'adaptation de cette structure à l'antigène imposé.* Une phase ultérieure peut faire intervenir le retentissement de cette nouvelle structure sur l'organisme générateur des protéines et stabiliser la fonction-anticorps. Mais un tel processus échappe encore au contrôle expérimental.

Si ce mécanisme est exact, il doit être possible de préparer *in vitro* une fonction-anticorps en adaptant spécifiquement un protéide quelconque à un antigène quelconque, ce qui constituerait une confirmation décisive de l'hypothèse. Or, le résultat de l'expérience n'est pas négatif.

XIV. — Préparation *in vitro*.

On peut faire apparaître *in vitro* une fonction-anticorps sur certains protéides ; mais cette transformation s'accompagne toujours de la dénaturation du protéide. La différence essentielle entre les deux processus *in vivo* et *in vitro* réside plus dans cette dénaturation que dans l'intensité de la fonction-anticorps.

Il suffit, en effet, de soumettre, vers pH = 8, un protéide à une contrainte, en présence d'une molécule organique choisie comme antigène, pour conférer au protéide un certain degré d'adaptation

spécifique pour cet antigène. Autrement dit, la présence de la molécule étrangère oriente spécifiquement la dénaturation et entraîne l'apparition d'une sorte de fonction-anticorps, d'intensité en général faible, mais douée d'un degré de spécificité parfois très net et qui dépend des conditions expérimentales. Voici, résumées brièvement, les caractéristiques principales de ces expériences.

D'après l'hypothèse précédente, n'importe quel protéide doit se prêter à l'apparition d'une fonction-anticorps avec n'importe quelle molécule en solution pure. Effectivement, l'expérience donne un résultat aussi satisfaisant avec l'ovalbumine qu'avec la γ -globuline (provenant de l'Homme ou du Cheval) ; le résultat reste le même si l'on emploie la γ -globuline provenant d'un sérum antidiphthérique à taux élevé d'anticorps. Par contre, un échec constant a été obtenu : 1° avec la sérum-albumine ; 2° avec les fractions d'euglobuline ($E_1 + E_2$) ; 3° avec des mélanges protéidiques complexes tels que le sérum total.

Les antigènes ont été constitués par les molécules suivantes :

Ethanol,
Xylose, arabinose, saccharose, raffinose,
Acétate, tartrate, phthalate de Na,
d-leucine,
Ethylamine, *p*-phénylènediamine.

Notons d'abord qu'il faut opérer en milieu légèrement alcalin, entre $\text{pH} = 7,8$ et $\text{pH} = 8$; vers le point isoélectrique et jusqu'à $\text{pH} = 7$, le résultat est nul.

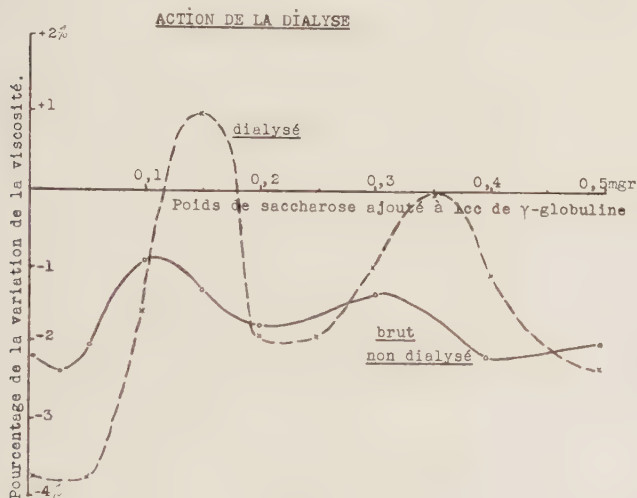
D'autre part, il faut l'intervention d'une contrainte extérieure. Le simple contact de l'antigène et du protéide est inefficace (à moins d'opérer, comme Pauling, en milieu beaucoup plus alcalin, vers $\text{pH} = 11$). L'action de la chaleur (50°) et du froid (-177°) est sans effet. On pouvait espérer que les pressions puissantes qui s'exercent lors de la congélation seraient actives : l'expérience est négative. Il convient d'ajouter que l'expérience a été faite en vase ouvert et qu'il faudrait opérer dans une enceinte assez solide pour s'opposer aux changements de volume. Pratiquement, nous avons opéré soit avec les ultra-sons, soit, d'une façon moins brutale, en faisant subir à la solution une cinquantaine de passages successifs à travers les chicanes d'un homogénéisateur (chicanes constituées par une vis ne remplissant pas exactement son écrou).

L'effet est proportionnel à la concentration de l'antigène, ce qui confirme bien l'hypothèse. En l'absence d'antigène, on obtient un produit dénaturé qui donne parfois une réaction faible avec n'importe quelle molécule.

Pratiquement, la solution protéique ($C = 5$ p. 100), additionnée de l'antigène et amenée à un pH compris selon l'expérience

entre 7,8 et 9, est soumise à l'action soit des ultra-sons, soit de l'homogénéisation pendant une durée de cinq à soixante minutes, à une température de 15° à 35°. Pour éliminer l'antigène, on amène le pH à 3 et on dialyse pendant sept jours sur ($\text{HCl } \frac{\text{N}}{5.000} + \text{NaCl } 7 \text{ p. } 1.000$). On ramène alors le pH à 7,4 et on effectue les mesures de viscosité. Les expériences comportent toujours un témoin constitué par la protéine traitée seule, sans antigène.

La courbe LXII montre la nécessité de la dialyse : une solu-



ACTION DE LA DIALYSE SUR L'APPARITION DE L'ADAPTATION « IN VITRO ».

Une solution de γ -globuline à 3,6 p. 100, additionnée de 1 p. 1.000 de saccharose, est soumise aux ultra-sons, à pH = 8. La solution est divisée en deux parties, l'une éprouvée directement, l'autre soumise d'abord à la dialyse acide. On constate que cette dernière seulement réagit avec le saccharose.

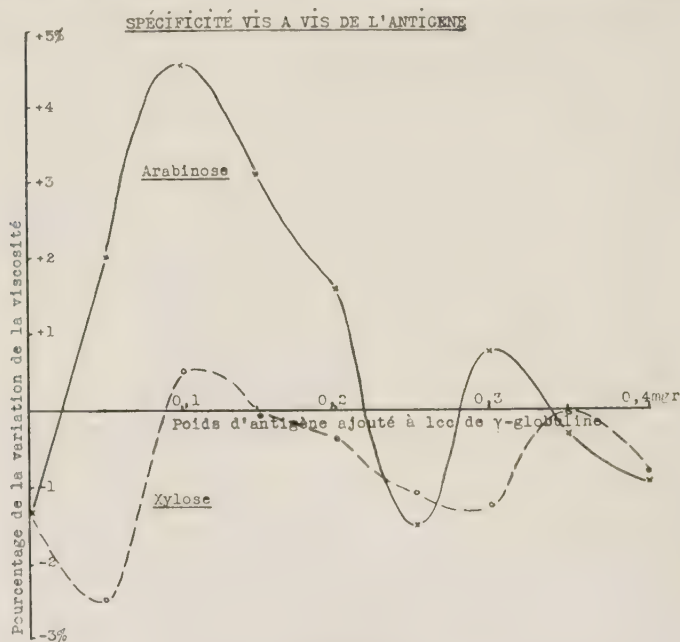
tion de γ -globuline est soumise aux ultra-sons à pH = 8 en présence de 1 p. 1.000 de saccharose. Cette γ -globuline, ramenée à 7,4, est inactive vis-à-vis du saccharose, mais le devient après dialyse acide prolongée pendant six jours.

L'action exercée par la concentration de la molécule antigénique ressort de l'examen des courbes LXIV et LXV. La γ -globuline est soumise aux ultra-sons en présence de quantités croissantes d'acétate de Na ou d'arabinose. On constate, dans les deux cas, que l'activité de la fonction-anticorps augmente avec la concentration de l'antigène.

Quant à la spécificité, elle apparaît parfois très étroite. Parmi

tout l'ensemble des expériences, le cas le plus favorable est reproduit par la courbe LXIII : il s'agit d'une solution de γ -globuline soumise aux ultra-sons en présence d'arabinose. Après dialyse acide, on éprouve le protéide avec l'arabinose et le xylose. La spécificité que l'on constate ici est comparable à celle des anticorps d'origine biologique.

En réalité, la spécificité doit être examinée sous deux angles différents. On doit rechercher d'abord si la fonction-anticorps



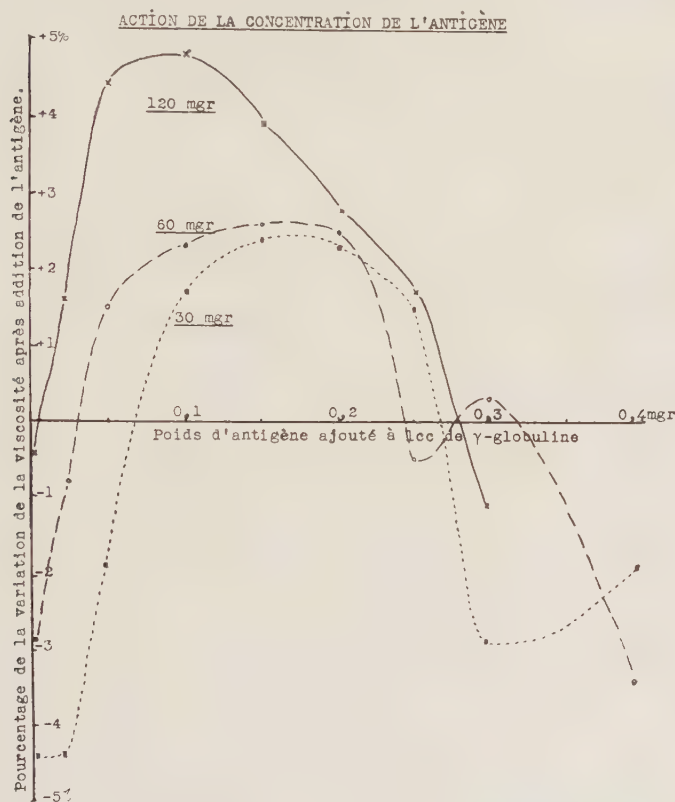
Courbe LXIII.

SPÉCIFICITÉ DE L'ADAPTATION DE LA γ -GLOBULINE « IN VITRO ».

Une solution de γ -globuline à 3 p. 100, additionnée de 1 p. 100 d'arabinose, est soumise pendant dix minutes aux ultra-sons. Après dialyse acide, l'épreuve de viscosité montre une adaptation à l'arabinose ; la réaction est au contraire à peine marquée avec le xylose.

réagit spécifiquement avec sa molécule antigénique (*spécificité relative*) et comparer ensuite l'effet de l'addition de l'antigène sur le protéide soumis aux ultra-sons à l'état pur, en l'absence de la molécule antigénique (*spécificité absolue*). Ce dernier point est très important ; car, si les conditions expérimentales ont entraîné un degré trop poussé de dénaturation, on constate que, consécutivement à sa dislocation, la molécule devient susceptible de réagir, d'une façon plus ou moins marquée, avec n'importe

quelle molécule. A ce point de vue, l'agitation — moins brutale — par l'homogénéisation est préférable à l'action des ultra-sons. On en trouve un exemple remarquable en comparant les courbes LXVI et LXVII. Dans le premier cas, on opère avec l'ovalbumine d'une part, le xylose ou l'arabinose d'autre part. On constate que l'ovalbumine, traitée par homogénéisation à



Courbe LXIV.

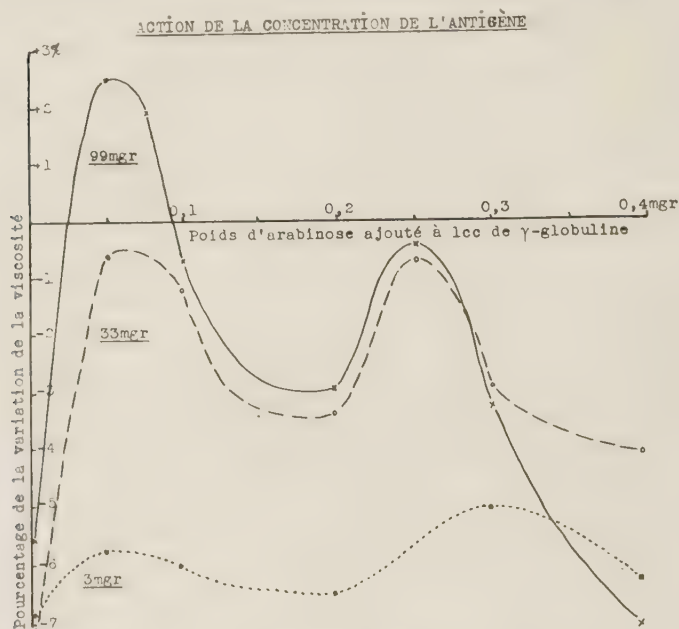
(Voir légende page suivante.)

pH = 9 en présence de xylose, réagit spécifiquement avec ce sucre et nullement avec l'arabinose : et réciproquement, quand l'arabinose joue le rôle d'antigène. De plus, l'ovalbumine, traitée seule à l'état pur, ne réagit avec aucun des deux sucres. Les spécificités relative et absolue sont alors satisfaisantes.

La courbe LXVII représente une expérience analogue, faite avec les deux sucres précédents, mais avec la γ -globuline et en opérant avec les ultra-sons. On constate que, là encore, la spéci-

ficité relative est satisfaisante, mais que la spécificité absolue est en défaut, par suite de l'action trop poussée des ultra-sons.

Ces deux expériences extrêmes sont reproduites à dessein, car elles ont l'intérêt de situer le problème de la spécificité dans les conditions que l'on rencontre constamment dans ces expériences : il est difficile de doser la contrainte exercée sur la molécule de façon à obtenir simultanément d'une part, un taux élevé de la



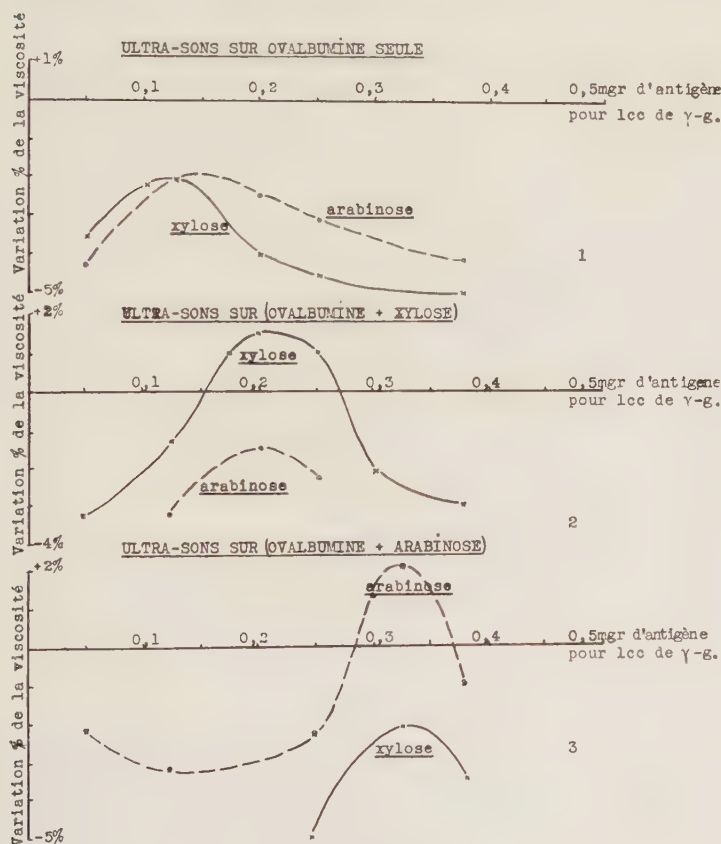
EFFET DE LA CONCENTRATION DE LA MOLÉCULE ANTIGÉNIQUE
SUR L'ADAPTATION « IN VITRO » PAR LES ULTRA-SONS.

Courbe LXIV : Trois essais, chacun de 60 cm³ d'une solution de γ -globuline à 3,6 p. 100, subissent, à pH = 8, l'action des ultra-sons, en présence d'acétate de Na (respectivement 30, 60, 120 mg) en quantités croissantes. Après dialyse acide, on constate que l'adaptation à l'acétate augmente proportionnellement à la concentration de l'antigène, utilisée dans la préparation.

Courbe LXV : Même expérience, mais avec l'arabinose et avec une solution de γ -globuline à 2,5 p. 100. Le phénomène présente la même allure que dans l'expérience précédente.

fonction anticorps et, d'autre part, des spécificités relative et absolue satisfaisantes. On trouve, dans la courbe LXVIII, un optimum qu'il est difficile de dépasser. Il s'agit de l'adaptation spécifique de l'ovalbumine au raffinose, à l'arginine ou à la phloridzine. Voici le protocole détaillé de l'expérience. On dissout, à pH = 8,5, 92 mg. de raffinose dans 10 cm³ d'ovalbumine à

2 p. 100 dans NaCl à 7 p. 1.000 ; le mélange est soumis aux ultra-sons pendant une heure. La température s'élève de 15° au début de l'opération jusqu'à 35° à la fin. La solution, ramenée à pH = 3, est dialysée pendant quatre jours à basse température, sur $(\text{HCl } \frac{\text{N}}{5.000} + \text{NaCl } 7 \text{ p. } 1.000)$. Ces conditions mettent hors de

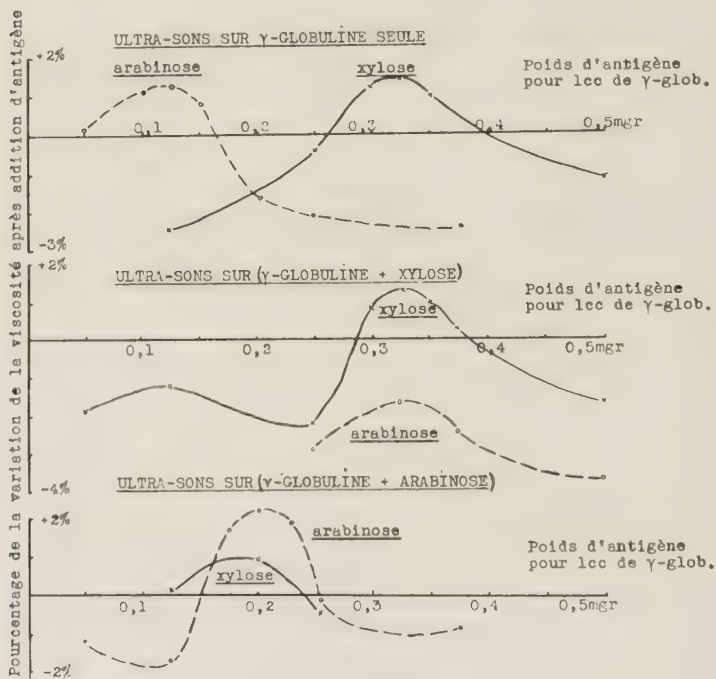


Courbe LXXI.

(Voir légende page suivante.)

cause les groupes dissociés du côté alcalin du point isoélectrique et responsables de la combinaison polaire avec le raffinose qui est éliminé par la dialyse. Finalement, on ramène la solution à pH = 7,4, et l'on pratique l'épreuve de viscosité, d'une part, avec le raffinose et, d'autre part, avec des molécules quelconques (arginine, phloridzine). La courbe (b) montre que la solution mani-

teste une augmentation de viscosité en présence du raffinose et que cette augmentation est beaucoup plus marquée avec le raffinose qu'avec des molécules quelconques. L'expérience répétée avec le nitrate d'arginine (34,5 mg.) et la phloridzine (72,3 mg.) donne chaque fois un résultat comparable [courbes (c) et (d)]. Les spécificités relatives sont donc satisfaisantes. Quant à la spéci-



Courbe LXXVII.

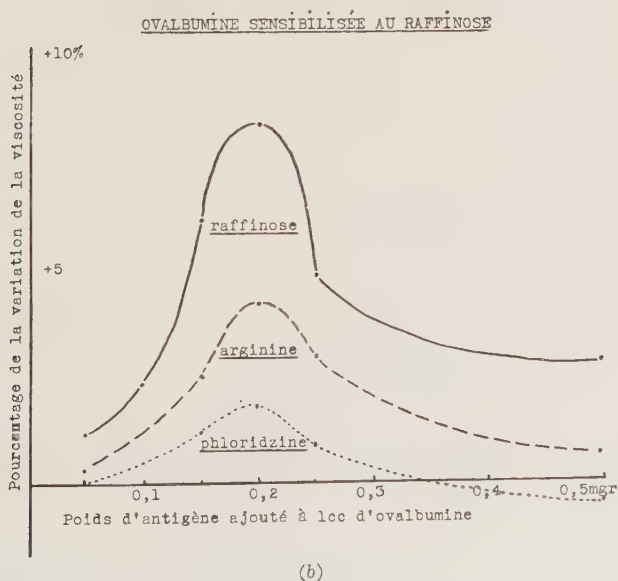
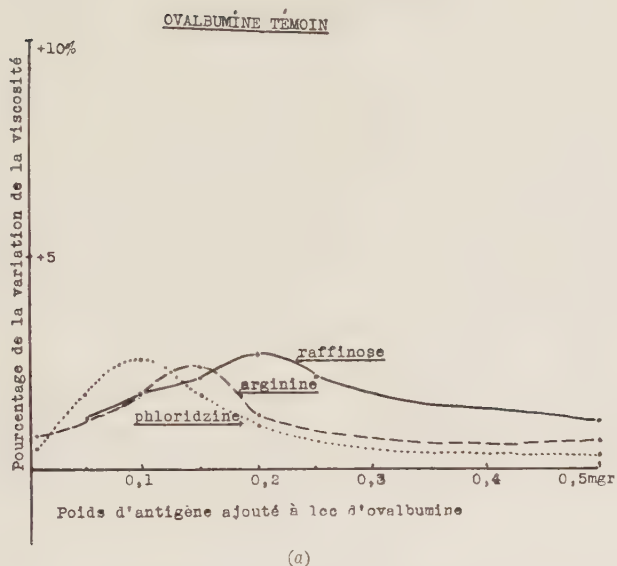
SPÉCIFICITÉ DE L'ADAPTATION « IN VITRO ».

Courbe LXVI : Une solution d'ovalbumine à 4 p. 100 subit, à pH = 9 et à 16°, 50 passages dans un homogénéisateur : 1° en solution pure (témoin) ; 2° additionnée de xylose ; 3° additionnée d'arabinose. Après dialyse, en milieu acide, les solutions sont éprouvées avec chacun des deux sucres. On constate : 1° que l'ovalbumine témoin ne réagit avec aucun des deux sucres ; 2° que l'ovalbumine, traitée en présence du xylose, réagit spécifiquement avec le xylose ; 3° que le traitement en présence de l'arabinose confère la spécificité vis-à-vis de ce dernier sucre.

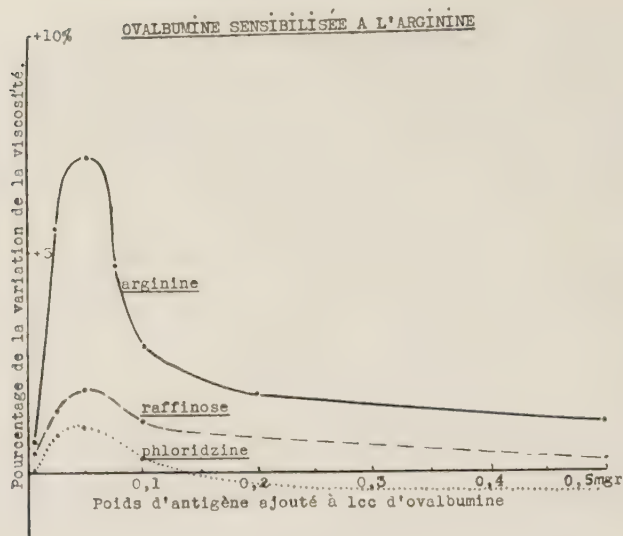
Courbe LXXVII : γ -globuline traitée par les ultra-sons soit seule, soit en présence de xylose ou d'arabinose. On retrouve finalement une spécificité relative comparable à la précédente, mais, par suite du traitement plus brutal, le témoin réagit indifféremment aux deux sucres.

ficité absolue, elle ressort de la courbe (a) qui est relative à l'ovalbumine, traitée seule par les ultra-sons.

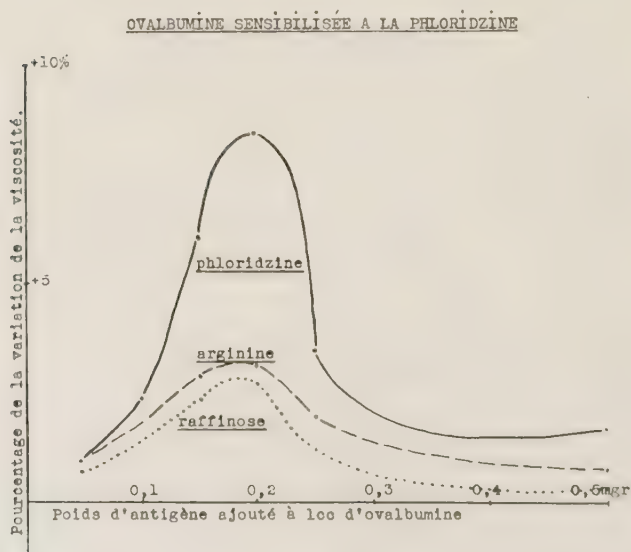
Cette distinction de la spécificité absolue et de la spécificité relative permet de comparer les résultats, obtenus ici à un pH



(Voir légende page suivante.)



(c)



(d)

Courbe LXVIII.

SPÉCIFICITÉ DE L'ADAPTATION DE L'OVALBUMINE « IN VITRO »

généralement compris entre 7,8 et 8,4 et n'atteignant 9 qu'exceptionnellement, avec le procédé et l'hypothèse de Pauling (3). Pauling suppose le déroulement de la chaîne polypeptidique et la libération de ses deux extrémités qui deviennent ainsi susceptibles de s'adapter à l'antigène. Deux facteurs seulement interviennent alors : la présence de l'antigène et une valeur élevée du pH (pH = 11). Cette technique, appliquée aux antigènes précédents, conduit aux résultats expérimentaux reproduits dans le tableau XIX. La spécificité relative est satisfaisante, comme il ressort de l'examen des colonnes verticales du tableau. Par contre, la spécificité absolue par rapport au témoin (globuline soumise au même traitement en l'absence d'antigène) est parfois

TABLEAU XIX. — **Procédé de Pauling.**

ÉPREUVE de viscosité	ANTIGÈNE en présence duquel la globuline a été traitée			
Expérience n° 1 :				
	Témoin	Arginine	Raffinose	
Avec :				
Arginine	+ 4,1	+ 7,6	+ 4,1	
Raffinose.	+ 3	+ 5,6	+ 4,3	
Expérience n° 2 :				
	Témoin	Antigène d-tartrique	Hydroquinone	Acide anthranilique
A. d-tartrique	+ 2,4	+ 4,2	+ 2,3	+ 2,9
Hydroquinone	+ 0,5	+ 3	+ 3,1	+ 2,9
A. anthranilique	+ 0,5	+ 2,7	+ 1,3	+ 2,9
Expérience n° 3 :				
	Témoin	Xylose	Acide salicylique	p-phénylène diamine
Xylose	+ 11,8	+ 13,2	- 1,8	+ 4
A. salicylique	+ 10,6	- 1,7	+ 3,4	+ 0,2
p-phénylène diamine.	+ 12,2	+ 12,7	+ 0,4	+ 11,6

(3) L. PAULING et D. H. CAMPBELL, *J. exp. Med.*, 1942, 76, 211.

peu marquée, ce qui doit être attribué à l'alcalinité trop élevée du milieu.

L'intérêt de ces expériences réside dans le fait qu'elles montrent la malléabilité des protéides et leur facilité d'adaptation à un antigène quelconque.

XV. — Discussion et conclusions.

L'hypothèse de la formation d'une fonction-anticorps par l'adaptation directe des globulines semble être confirmée ainsi par ces deux derniers faits expérimentaux : la rapidité extrême de la formation de l'anticorps *in vivo* et l'expérimentation *in vitro*, malgré les réserves qu'imposent à la fois la dénaturation et la spécificité parfois peu marquée.

On peut remarquer que la technique de préparation rapide par doses massives est restée inaperçue tant que l'expérimentation a porté sur les seuls antigènes protéidiques, où l'on ne pouvait dissocier la succession obligatoire des trois phases initiales :

1° L'apparition presque instantanée de la fonction anticorps, par une adaptation qui évoque la loi de Lenz généralisée ;

2° Une phase pouvant se prolonger quelques jours, où l'anticorps qui vient d'être formé est saturé et par conséquent masqué par l'excès d'antigène ;

3° Une phase finale où l'anticorps reste seul présent dans la circulation.

A ce stade succède une période où l'anticorps subit un perfectionnement progressif. Avec les antigènes étudiés ici, l'observation en est facilitée : une prolongation de la préparation de l'animal entraîne à la fois l'augmentation du test de viscosité et l'apparition du pouvoir flocculant. Or, comme on l'a déjà rappelé précédemment, le même phénomène s'observe quand on prépare le Lapin avec les pseudo-globulines de Cheval : on assiste au perfectionnement continu d'un anticorps qui était élaboré, mais sous une forme très élémentaire, dès la première injection préparante.

En résumé, l'existence d'anticorps correspondant spécifiquement aux molécules organiques de faible poids moléculaire entraîne une extension considérable du domaine de l'immunité qui doit désormais englober l'ensemble des molécules organiques. La formation de ces anticorps — ou tout au moins le premier stade de leur formation — peut être attribuée à une adaptation spécifique que les γ -globulines subissent presque immédiatement par le contact direct de l'antigène : il s'agit à ce moment d'une fonction-anticorps, supportée sur un constituant normal du plasma et dont l'apparition dépend d'une succession définie d'actions physico-chimiques.

MODE DE MULTIPLICATION DU BACILLE DE KOCH.
MORPHOLOGIE
DU BACILLE ET DE SES COLONIES.
QUELQUES SOURCES D'ERREURS.

par JEVREM NEDELKOVITCH.

(Clinique Phtisiologique, Belgrade.
Directeur : professeur NEDELKOVITCH.)

Dans nos publications antérieures [1, 2] nous avons décrit l'aspect morphologique du bacille de Koch, celui de ses colonies jeunes et adultes, et donné notre opinion sur le mode de sa multiplication. Si nous revenons sur ce même sujet, c'est pour y apporter quelques documents complémentaires et pour essayer de mieux formuler notre conception, car les avis étant encore partagés, le problème reste ouvert.

Etant donné que treize ans se sont écoulés depuis nos publications sur ce sujet, il nous semble nécessaire de rappeler succinctement notre documentation d'alors.

Pour ces études nous nous sommes servi du milieu de Buc, sur lequel nous avons ensemencé des exsudats bacillifères. En sortant souvent les supports de coton de ce milieu et en les colorant par la méthode de Ziehl-Neelsen, nous avons pu observer les stades principaux du développement des colonies *in situ*, sans *dérangement ni blessure*, de sorte que leur forme et leur structure originale ont pu être étudiées depuis le troisième jour jusqu'à ce qu'elles deviennent visibles à l'œil nu (le douzième jour). Les traits caractéristiques de ce développement ont été résumés dans notre Rapport à la IX^e Conférence de l'Union Internationale contre la Tuberculose (Varsovie, 1934) et dans le mémoire paru dans ces *Annales* en août 1936.

Comme exemple de notre documentation d'alors nous décrivons l'histoire de la culture n° 667, qui résume bien cette documentation et pour laquelle nous avons trouvé une nouvelle étape de développement, celle du neuvième jour. Nous avons vu les colonies de cette culture les troisième, cinquième, neuvième, douzième et trente et unième jours et en avons donné des microphotographies en couleurs dans le mémoire cité. De l'étape du neuvième jour, remarquée en 1942, lors d'une revision des pré-

parations faites en 1934, nous avons fait des dessins aussi exacts que possible, ne disposant pas alors de moyens techniques pour faire des microphotographies en couleurs.

CULTURE 667.

C'est en ensemençant sur le milieu de Buc le dépôt d'un exsudat trouble du pneumothorax M. B. gardé quinze jours à la température du laboratoire que la culture 667 a été obtenue.

FIG. 2.

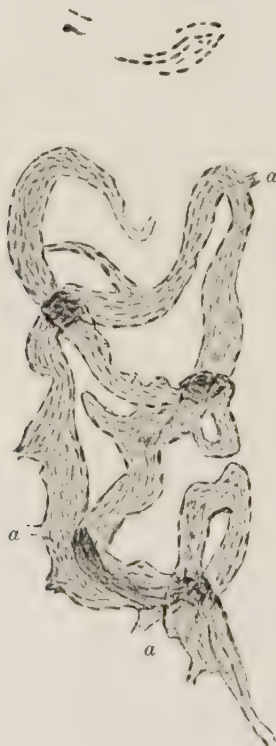


FIG. 6.

FIG. 2. — Une des nombreuses colonies trouvées le cinquième jour, composée de rangées de bâtonnets rouges, tous en voie de division.

FIG. 6. — La colonie 5 au fort grossissement : on distingue bien un cordon entortillé composé de rangées de bâtonnets rouges, fragmentés eux-mêmes.

1° Dans le dépôt étalé et coloré au Ziehl-Neelsen avant son ensemencement, le 14 avril 1934, furent trouvés, après recherche de plusieurs heures, quelques bâtonnets acido-résistants et de

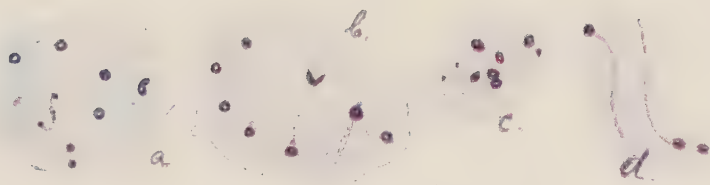


FIG. 1. — *a*, Une goutte du dépôt purulent de l'exsudat d'où est obtenue la culture 667 étalée et colorée au Ziehl-Neelsen avant l'ensemencement; on voit des granules noirs libres que l'on trouve facilement et quelques bâtonnets acido-résistants trouvés après recherches de plusieurs heures. Colonies âgées de deux jours : *b*, de nombreux bâtonnets rouge-violet sortant des granules noirs; *c*, amas de ces mêmes bâtonnets; *d*, bâtonnets très longs commençant à se fragmenter.

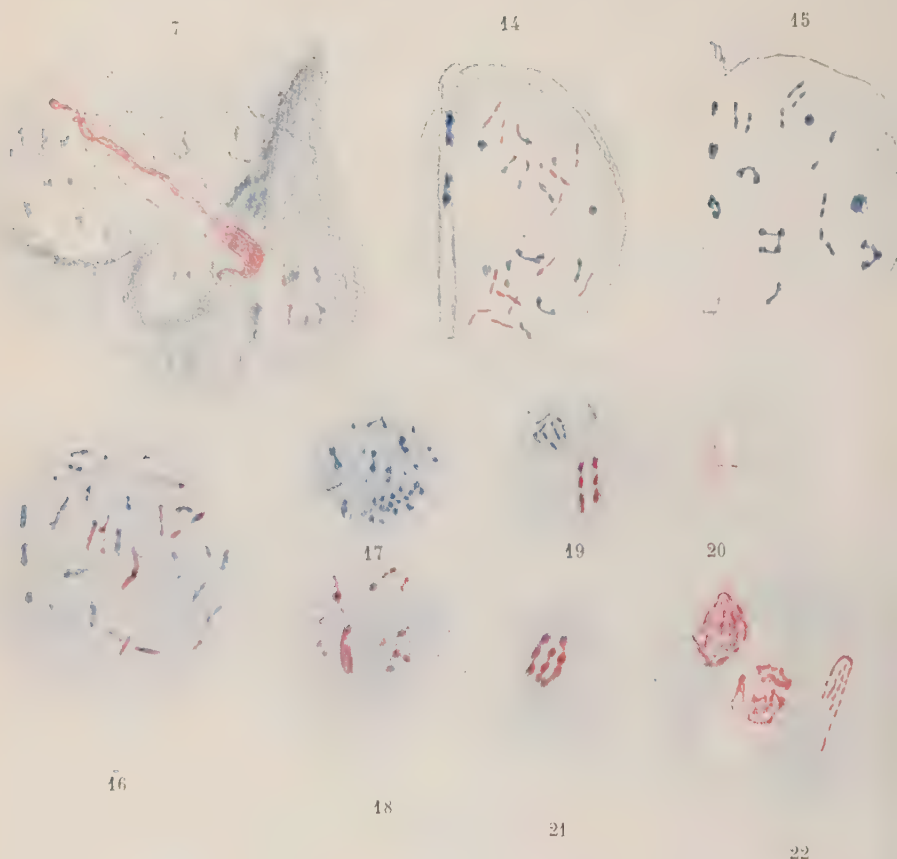


FIG. 7. — Colonie entourée de matériel de décomposition cellulaire.

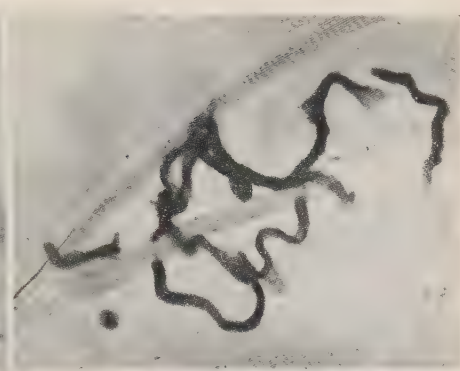
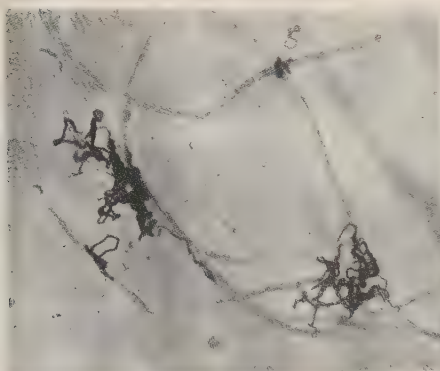
FIG. 14. — Culture 339 sur le milieu du Buc : à côté des bâtonnets acido-résistants on voit des bâtonnets et des granules non acido-résistants, sans aucun rapport les uns avec les autres.

FIG. 15. — Milieu de Buc stérile : on voit les mêmes granules et bâtonnets cyanophiles que dans la figure 9.

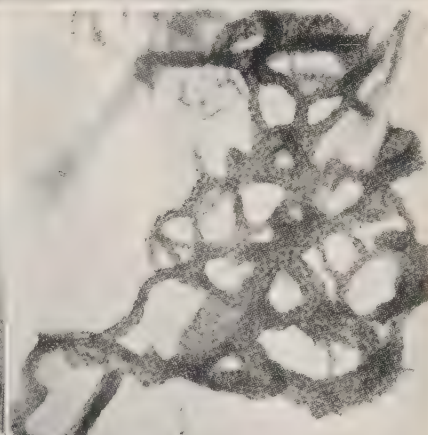
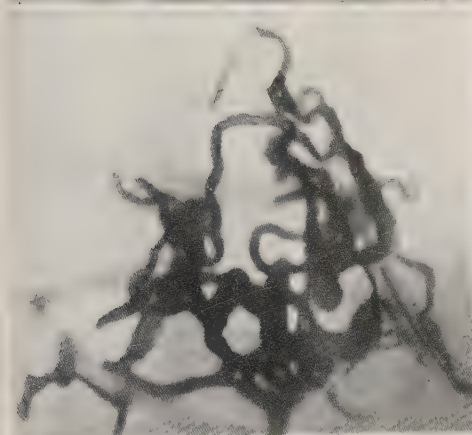
FIG. 16. — Frottis du milieu de pomme de terre glycinée stérile; on y trouve de nombreux granules, des diplocoques et des bacilles cyanophiles, ainsi que des bâtonnets faiblement rouges.

FIG. 17. — Frottis du milieu à l'œuf de Hohn : on y trouve des granules cyanophiles, des diplocoques et diplobacilles et des bâtonnets rouge violet.

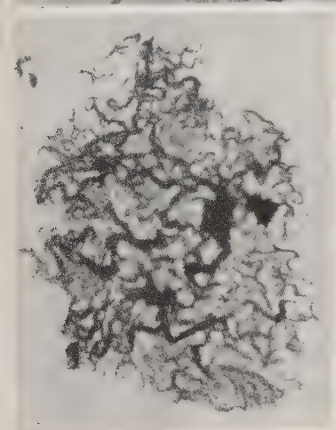
FIG. 18, 19, 20, 21 et 22. — Frottis du milieu de Löwenstein de l'Institut Pasteur de Paris 1947 faits dans des tubes neufs : on trouve assez facilement des amas ressemblant à s'y méprendraient des amas de bacilles rouges, ainsi que des petits groupes de granulations coccoides.



9



11



12



13

FIG. 8. — Culture 667 : aspect des colonies le douzième jour.
Ce sont des cordons entortillés autour des fils de coton du milieu de Buc.

FIG. 9, 10 et 11. — Ces colonies vues au plus fort grossissement, sont toutes composées de rangées de bâtonnets acido-résistants.

FIG. 12. — Aspect d'une jeune colonie en voile (âge de cinq jours). La couche attenante au milieu est un réseau de rangées de bâtonnets rouges; la couche superficielle est formée de cordons semblant en tous points à ceux de la figure ci-dessus.

FIG. 13. — Colonie en voile plus âgée : les cordons sont particulièrement visibles.

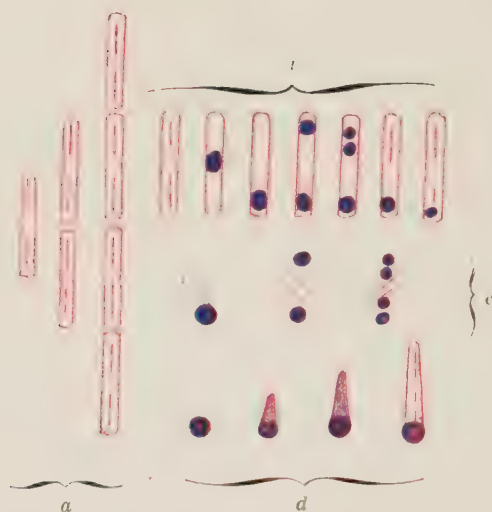


FIG. 25. — Représentation schématique de la multiplication du bacille tuberculeux : *a*, division directe; *b*, formation des granules noirs intrabacillaires; *c*, libération des granules noirs; *d*, germination de ces granules libres et passage à la division directe.

nombreux granules noirs libres représentés sur la figure 1, *a*.

2° Colonies âgées de deux jours. — Le 16 avril, on voit de nombreux bâtonnets à granules unipolaires, dont certains courts et rouge violet, d'autres moyennement longs, franchement rouges et deux très longs. Dans ces deux derniers on distingue une substance centrale rouge bordeaux fragmentée et une zone périphérique rouge clair (fig. 1, *b*, *c*, *d*).

3° Colonies âgées de cinq jours. — Le 19 avril furent trouvées plusieurs petites colonies. L'une d'elles est représentée par le

FIG. 3.

FIG. 4.



FIG. 5.

FIG. 3, 4 et 5. — Aspect des colonies le neuvième jour
toutes sont formées par des files de bâtonnets rouges.

dessin 8, *e* du mémoire cité, une autre par le dessin figure 2 du présent mémoire. Toutes ces colonies sont constituées par les bâtonnets acido-résistants typiques, fragmentés, sans aucun autre élément.

4° Colonies âgées de neuf jours. — Etape remarquée en 1942.

Sur la préparation du 23 avril 1934 on trouve sur une même lame 4 colonies (fig. 3, 4, 5, 7). Trois de ces colonies se présentent déjà comme des cordons pelotonnés et la quatrième comme un cordon presque droit.

Toutes ces colonies sont constituées par des bâtonnets rouges, fragmentés et alignés bout à bout, groupés en faisceaux et en cordons. Aucun autre élément n'est visible, ni dans les colonies ni même près d'elles. Aucun bâtonnet n'est visible en dehors des colonies.

Autour de la 4^e colonie, par contre, il y a des granules bleus, de différentes grandeurs (fig. 7), qui ne sont autre chose que des produits de décomposition cellulaire (leucocytes, cellules endothéliales) ou autres déchets.

Sur le dessin (fig. 6) qui représente la 5^e colonie au fort grossissement, à certaines places du cordon principal, on voit des excroissances en forme d'épines (*a*) qui donneront naissance aux cordons collatéraux et qui formeront des traits d'union entre les différentes circonvolutions du cordon principal.

5^e Colonies âgées de onze jours. — Le douzième jour, les colonies sont déjà visibles à l'œil nu comme de petites nodosités sur les fils de coton du support du milieu de Buc. Au petit grossissement elles ont la forme de cordons pelotonnés bien illustrés par la figure 13 du mémoire cité et par les figures 8, 9, 10, 11, en noir, du présent travail. Les circonvolutions de ces cordons sont reliées par des cordons collatéraux.

Ces cordons sont faits de rangées de bâtonnets acido-résistants, alignés bout à bout. Dans les lignées isolées et parfaitement visibles dans toute leur longueur on peut constater encore une fois, d'une manière indubitable, que dans leur composition n'entrent que des *bâtonnets rouges*, fragmentés.

Dans les cordons plus épais on trouve assez fréquemment des bâtonnets avec des granules noirs intrabacillaires. En s'agrégeant dans les différents plans de la colonie, ces granules donnent l'impression d'îlots noirs.

6^e Colonies âgées de trente et un jours. — Les colonies âgées de trente et un jours présentent la même structure que celles de douze jours. Elles sont seulement plus grandes, leurs cordons plus épais et plus entassés. Les bâtonnets contiennent également des granules noirs intrabacillaires.

*
* *

Pour compléter le résumé de notre documentation nous résumerons en quelques mots ce que nous avons écrit sur la forme et la constitution des voiles et d'un seul bacille. Nous y ajouterons aussi une courte description des colonies développées sur le milieu solide de Löwenstein.

FORME ET CONSTITUTION DES VOILES.

Les voiles très jeunes, développés à la surface du milieu de Buc n'ont d'abord qu'une seule couche constituée par des rangées de bâtonnets acido-résistants alignés bout à bout avec tendance précoce à former des mailles. Dès le cinquième jour, nous avons vu par-dessus cette couche, attachant au milieu, une seconde couche constituée par des faisceaux des mêmes rangées de bâtonnets

acido-résistants groupés cette fois-ci en cordons plus ou moins gros. Ces cordons sont semblables à ceux des colonies développées sur le support du milieu de Buc, avec la seule différence qu'ils s'étendent suivant le plan horizontal, alors que les autres s'étendent dans tous les plans.

Les photographies en noir (fig. 11) et en couleurs (fig. 15, 16, 17, 19 et 20) du mémoire cité et les figures 12 et 13 en noir du présent travail illustrent bien et de façon non équivoque ce que nous venons de dire.

Dans les colonies plus âgées les cordons sont plus gros, on y trouve fréquemment des bâtonnets avec granules noirs intrabacillaires.

LA STRUCTURE DES COLONIES SUR MILIEU DE LÖWENSTEIN.

En examinant avec notre collaboratrice le Dr K. Vuckovic les petites colonies prélevées en entier sur le milieu solide de Löwenstein, nous leur avons trouvé la même forme et la même constitution qu'à celles en milieu de Buc. Ce sont des cordons tordus de rangées de bâtonnets alignés bout à bout, tous acido-résistants.

LA STRUCTURE D'UN BACILLE.

Le bacille coloré au Ziehl-Neelsen présente deux parties : la partie centrale rouge bordeaux (le protoplasme) et la partie périphérique, rouge clair (la membrane). Le protoplasme est le plus souvent divisé en fragments primaires et ceux-ci en fragments secondaires. La membrane présente parfois un léger étranglement au niveau de l'espace entre les fragments primaires.

Granule noir. — Très souvent la partie centrale est remplacée par des particules ovoïdes qui sont bleu foncé presque noires au Ziehl-Neelsen et que nous appelons *granules noirs*. Quand tout le protoplasme du bacille est remplacé par un seul granule, il est gros et placé soit au milieu, soit à une extrémité. Quand les deux fragments primaires sont remplacés chacun par un granule, les deux granules sont plus petits et placés aux deux extrémités du bacille ; lorsqu'il s'agit des fragments secondaires, ils sont encore plus petits. Il n'est pas rare de trouver qu'un fragment primaire se soit transformé en granule noir, alors que l'autre reste rouge bordeaux et enfin que certains fragments secondaires deviennent des granules noirs alors que les autres restent rouges. Ces variations prouvent que *le granule noir est la seconde forme morphologique sous laquelle le protoplasme bacillaire peut se présenter. C'est du protoplasme condensé.*

Les granules noirs intrabacillaires deviennent libres par la déhiscence et la cassure de la membrane (fig. 4 du mémoire cité et 25 du

présent), comme nous l'avons vu dans les cultures laissées à la température du laboratoire pendant plus de deux ans. Il y a une différence importante entre les granules noirs libres et ceux qui sont intrabacillaires.

Les granules noirs libres doivent germer pour recommencer la vie active. Ils ont donc les propriétés des spores. Les granules noirs intrabacillaires, par contre, ne doivent pas germer, ils peuvent simplement s'allonger, reprendre la couleur rouge et recommencer à se fragmenter.

CAUSES D'ERREURS POSSIBLES DANS LES ÉTUDES DU DÉVELOPPEMENT DU B. K.

En 1933 nous pensions comme Fontès, Vaudremer, Courmont, Sergent, Bozançon et Philibert, Calmette et Valtis, Karwacki, Paneck et Zakharoff, Kedrovsky, Reenstierna, Ravetla Pla y Armengol, Sweany, Morton Kahn, Hauduroy, etc., que le bacille dans son développement, avant d'arriver à l'acido-résistance, passe toujours par un stade non acido-résistant. Nous pensions ainsi parce que nous rencontrions constamment toutes sortes de granules et de bâtonnets non acido-résistants et à demi acido-résistants dans les frottis colorés au Ziehl-Neelsen, lorsque, dans la recherche des colonies les plus jeunes, nous les prélevions par grattage de la surface des milieux ensemencés solides (Petroff, Hohn, Löwenstein, Petagnani). Dans le milieu de Buc ensemencé nous trouvions également, à côté des colonies acido-résistantes, des granulations bleues de toutes formes et de toutes grandeurs, ainsi que des bâtonnets bleus ressemblant par la forme, la grandeur, les renflements bi- et unipolaires aux bacilles acido-résistants (fig. 14 en couleurs).

Mais, ne réussissant pas, après de nombreuses et longues recherches, à voir un lien entre ces formes se trouvant les unes à côté des autres, nous fîmes des frottis des milieux stériles, non ensemencés. Notre surprise fut grande lorsque nous trouvâmes dans ces frottis colorés au Ziehl-Neelsen toutes les formes décrites plus haut. Dans tous les milieux à l'œuf ainsi que dans celui de Buc et à la pomme de terre, on trouve souvent des granulations et des bâtonnets bleus, violets, roses et même rouges. Les dessins en couleurs (fig. 15, 16, 17) en font foi.

Dernièrement, nous avons rencontré des granulations et des bâtonnets bleus et aussi des amas de bâtonnets rouges dans les tubes du milieu de Löwenstein faits à l'Institut Pasteur de Paris, et cela à deux reprises : la première fois en juillet 1947, la deuxième fois en juillet 1948. La dernière fois, les tubes à essai étaient neufs (fig. en couleurs 18, 19, 20, 21, 22).

E. J. Politova et M. V. Triousse (Moscou) [40] ont, en 1935,

dans les produits de raclage des milieux à l'œuf stériles, trouvé cinquante-huit fois sur 600 tubes des bâtonnets acido-résistants. Ces auteurs pensent que ces corps bacillaires proviennent des œufs de poules tuberculeuses.

Il est probable que certaines images de coques, de diplocoques et de bâtonnets sont les corps de véritables bactéries mortes qui se trouvaient dans le matériel employé. Mais les images de granules peuvent certainement provenir aussi du matériel employé lui-même (pommes de terre, œufs, lait, etc.).

Supposant que les cellules en décomposition (leucocytes, cellules endothéliales) pouvaient être également la source de granules dans nos ensemencements d'exsudats, comme l'avaient déjà démontré Cornet, Meyer, Gottstein, Kahn, Wilson, Schwabacher pour les leucocytes et les hématies (cité d'après L. Costil) [13], nous avons examiné les sédiments des vieux exsudats gardés plus ou moins longtemps à la température de la chambre ou à l'étuve. A côté des cellules normales furent trouvées des cellules en décomposition dans lesquelles on voit, en effet, des granules, des diplocoques et des bâtonnets bipolaires.

Les granules, les diplocoques, les bâtonnets peuvent provenir des cellules en décomposition du matériel ensemencé, comme des milieux de culture eux-mêmes.

Il n'y a aucun doute, pour nous, que bien des granules, de diplocoques et de diplobacilles « cyanophiles », mis en rapport avec le bacille de Koch proviennent des milieux de culture et des cellules en décomposition. Ainsi, les granules des microcultures qu'on ne réussit pas à repiquer mais que l'on récolte après le grattage de la surface du milieu ensemencé et ceux des microcultures des formes filtrables du bacille de Koch sont très probablement de cette provenance.

DISCUSSION.

De nos documents on peut tirer des renseignements précis : 1° sur la forme des colonies ; 2° sur la structure de ces colonies, et enfin, 3° sur la forme et la structure du bacille lui-même. Ces renseignements appellent une conclusion sur le mode de la multiplication et sur l'interprétation de la morphologie du bacille.

Les colonies développées sur le support du milieu de Buc et les voiles ont, dès le cinquième jour, la forme de cordons. Ces cordons croissent en longueur. Leur croissance en longueur ne peut se faire que si les éléments qui les constituent se multiplient par division transversale. S'ils se multipliaient autrement, les colonies ne pourraient avoir la forme de cordons.

Les cordons sont constitués par des lignées de bâtonnets acido-résistants. Cette constitution n'est possible que si la croissance des éléments constitutifs se fait suivant l'axe longitudinal et la même multiplication par division transversale.

La forme et la structure morphologique du B.K. démontrent la même chose. Le bacille étant un bâtonnet, il croît en longueur. Entouré d'une membrane, son protoplasme est fragmenté. La fragmentation du protoplasme n'est que l'expression de la division transversale directe. *Les fragments sont des parcelles du protoplasme qui se divise au fur et à mesure qu'il croît.* Les fragments primaires deviendront des bacilles nouveaux, les fragments secondaires donneront des fragments primaires.

Lorsqu'on a des anomalies de développement, le protoplasme, tout en s'allongeant, peut ne pas se fragmenter, la membrane ne pas se scinder, de sorte qu'apparaissent des bâtonnets géants, de véritables fouets, représentés sur les figures 23 et 24 de notre mémoire citée. Ces anomalies démontrent également que la croissance du bâtonnet se fait en longueur et sa multiplication par la division directe.

Quant au *granule noir libre* nous admettons qu'il doit d'abord *germer* pour commencer la multiplication. Le germe rouge violet s'allonge et dès qu'il a atteint une certaine longueur, le protoplasme rouge bordeaux et la membrane s'y différencient. Le protoplasme commence aussitôt à se fragmenter, inaugurant ainsi la multiplication habituelle par division transversale.

Le granule noir, intrabacillaire, ne doit pas germer ; il peut disparaître et redevenir du protoplasme rouge bordeaux puis se diviser comme d'habitude.

En ce qui concerne la capacité de germer du granule noir libre, nous n'avons obtenu que des preuves indirectes, mais très valables. Ainsi les nombreux bâtonnets à granules unipolaires trouvés dans la culture 667 âgée de quarante-huit heures ne peuvent être compris que comme des germes de granules noirs libres trouvés en quantité dans le dépôt purulent. La preuve directe de la germination du granule a été donnée, comme nous le verrons, par K. Hu [3].

Depuis la publication de notre mémoire en 1936 nous avons eu connaissance de plusieurs travaux importants sur le même problème.

Gernez-Rieux et ses collaborateurs [9] donnent, des colonies du bacille virulent, développées dans le milieu de Dubos (1948), ainsi que D. Jegian et J. Kurung [8] des voiles sur le milieu synthétique de Long (1948), des images identiques à celles que nous en avons données en 1934 et 1936.

K. Hu (1936) [3], en observant le développement d'un seul bacille du type aviaire et d'un seul granule du type aviaire et humain, admet que la multiplication *du bâtonnet même* se fait par division transversale et par bourgeonnement. Le bourgeonnement se fait soit en partant du bout libre ou de la ligne de séparation des bactéries filles, soit d'un point quelconque de la membrane, ce

qu'il appelle la dichotomie. La dichotomie ne se fait pas dans le bouillon glycérimé. Dans l'ensemble, la division transversale est le mode le plus fréquent. En observant un granule isolé, Hu a vu qu'il germait d'abord, pour donner en se divisant une colonie typique de bâtonnets acido-résistants.

Bretey et Browaeys [4], en observant le développement des bâtonnets isolés du bacille de la fièvre, admettent aussi la division transversale directe et le bourgeonnement comme deux modes de multiplication. Les bactéries filles sont généralement acido-résistantes, mais certaines le sont moins. Les auteurs supposent que, dans le premier cas, il y avait « scissiparité, la cellule mère donnant deux filles égales entre elles par la taille et la coloration ». Dans le second cas, ils ont l'impression qu'il y a une sorte de bourgeonnement et que la cellule fille est non seulement plus petite, mais aussi nettement moins acido-résistante que la cellule mère...

Quoique les observations de K. Hu et de Bretey et Browaeys concordent d'une façon générale avec les nôtres, il y a d'importantes différences entre nos conclusions et celles de ces auteurs. N'ayant jamais vu un bâtonnet bourgeonner, nous n'admettons que la *division directe* comme mode habituel de multiplication du bâtonnet même. La structure des colonies jeunes ou vieilles aussi bien que la structure morphologique du bacille parlent en faveur de notre conception. On pourrait cependant se représenter que le protoplasma d'un bâtonnet ou de ses premiers descendants croisse, tant qu'il y a assez d'espace autour d'eux, non seulement dans l'axe longitudinal, mais aussi dans une direction quelconque et précisément à la ligne de séparation des bactéries filles, ce qui pourrait être pris pour une sorte de bourgeonnement. Dans les colonies constituées, par contre, le manque d'espace ne permet pas ce développement du protoplasme en dehors de l'axe longitudinal. Si les bâtonnets continuaient à bourgeonner ou à se dichotomiser les colonies ne pourraient avoir ni la forme, ni la structure intime qu'elles ont effectivement. Sur les microphotographies de K. Hu, on ne voit des bourgeons que sur des bâtonnets isolés, on n'en voit pas dans les colonies.

Sur les microphotographies de Bretey et Browaeys on peut compter, en partant du bâtonnet n° 1, 1 bourgeon contre 6 divisions transversales après sept heures quarante-cinq.

Nous admettons, par contre, que le *granule noir libre seul, germe d'abord pour se multiplier par la division transversale directe, dès que sa pousse a atteint une certaine longueur.*

K. Hu a confirmé cette conception quant au granule, puisqu'il a pu voir un granule isolé germer et donner une colonie typique de bacilles acido-résistants.

Dans les travaux de A. A. Imsenecky [5] sur la substance nucléaire des bactéries, nous trouvons également une confirma-

tion de notre conception. Cet auteur admet que les nucléoprotéides, pendant l'activité normale du protoplasme, sont dispersés dans celui-ci, tandis qu'à l'état de repos ils se ramassent en granules (spores, microcystes). Cet état de repos est réversible, ainsi que la forme du granule qui en est l'expression, tout cela restant dans le cadre physiologique.

Nos *granules noirs* seraient donc de la substance nucléaire en état de repos momentané, réversible ou définitif et irréversible. Les *granules noirs intrabacillaires* représentent un état réversible. Les *granules noirs libres* un état irréversible. Le granule noir libre a donc une des fonctions de la spore : il doit germer pour recommencer la vie active.

D. Jegian et Kurung estiment que les granules « beaded form »,

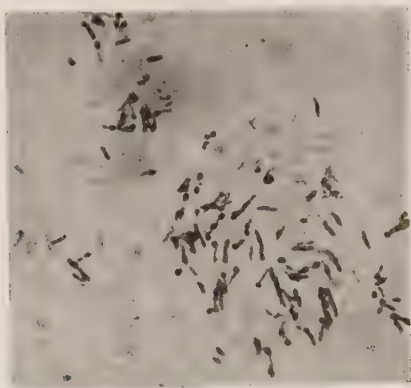


FIG. 23. — Bacilles BCG provenant du vaccin fait la veille, colorés au Ziehl-Neelsen : on y voit de nombreux granules noirs intrabacillaires.

qui sont « dark purple », sont des produits artificiels dépendant uniquement de la concentration des chlorures ou des acétates dans la couleur employée. L'alcool à 95 p. 100 les supprimerait instantanément, tandis que la recoloration les ferait réapparaître. Nous ne pouvons pas admettre cette explication pour les granules noirs, d'abord parce que nous n'avons pas pu confirmer les constatations de ces auteurs quant à l'effet de l'alcool à 95 p. 100, ensuite parce que nous avons vu des granules noirs dans les bâtonnets du BCG à l'état natif où il ne pouvait s'agir d'artifices de coloration (fig. 23 et 24 en noir).

Lembke et Ruska [6], dans les études faites à l'aide du microscope électronique, trouvent aussi des granules plus ou moins nombreux de différentes grandeurs (macro- et microgranules) qu'ils prennent pour des corps lipoides. Dans les bâtonnets où apparaissent les granules, le protoplasme devient transparent et

pauvre au point de vue structurel, ce qui concorde avec nos observations.

Il nous semble inutile de dire que sous le nom de granules il ne faut comprendre que les granules noirs, que les fragments rouges du protoplasme ne sont pas des granules et qu'ils n'indiquent pas un état de souffrance du bacille, comme certains auteurs le soutiennent (Bergeron et M^{lle} Mézière, par exemple) [12].

Une autre différence entre les conclusions des auteurs cités et les nôtres se rapporte à l'acido-résistance. Alors que K. Hu a trouvé 2 colonies âgées de vingt-quatre heures non acido-résistantes contre 266 acido-résistantes, Bretey et Browaeys constatent souvent la non acido-résistance, mais trouvent qu'elle est arbitraire

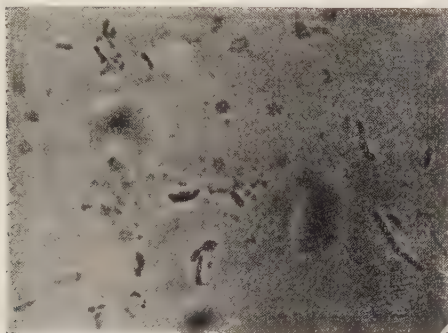


FIG. 24. — Les mêmes bacilles BCG non colorés photographiés à l'état natif : on y voit les mêmes granules intrabacillaires que dans la préparation colorée.

et imprévisible. Hauduroy [7] l'admet, par contre, comme un phénomène constant : les bacilles jeunes sont non acido-résistants et ils ne deviennent acido-résistants qu'après mûrissement. Il cite sans réserve H. D. Ravitch-Birger et A. A. Svinkina qui affirment que « des colonies âgées de vingt et un jours sont entièrement non acido-résistantes, que des colonies âgées de cinq cent trente-deux jours sont entièrement acido-résistantes ».

Cette constatation de Ravitch-Birger et Svinkina ne peut pas être exacte pour les milieux habituels, car nous avons trouvé dans le milieu de Buc déjà le troisième et le cinquième jour des colonies entièrement acido-résistantes. On peut se représenter que dans les milieux spéciaux comme ceux de Vaudremer, de Dostal, ou après agitation dans les cultures homogènes d'Arloing et Courmont, ou dans d'autres conditions spéciales, le bacille perd son acido-résistance et qu'il reste non acido-résistant tant qu'il se développe dans ces milieux ou dans de telles conditions. Mais il est difficile de comprendre que dans un milieu propice le bacille

soit d'abord « cyanophile », puis acidophile après un mûrissement de vingt et un jours. Car un bâtonnet de la fléole, par exemple, se partage en deux en une demi-heure d'après Bretey et Browaëys. L'ancien bâtonnet disparaissant ainsi en trente minutes, lequel des deux bâtonnets est le bâtonnet originel et lequel restera pour « mûrir » ? Le mûrissement ne peut durer que pendant la demi-heure que dure la vie d'un bâtonnet de la fléole comme tel, ou pendant quelques heures (dix-douze) s'il s'agit d'un bâtonnet des types mammifères. Le bâtonnet qui garde longtemps son individualité n'est plus normal. Comment peut-il persister normalement cinq cent trente-deux jours ?

Dans les *frottis* des cultures jeunes ou vieilles acido-résistantes elles-mêmes, nous avons aussi souvent vu des bâtonnets bleus, plutôt dans les couches profondes des frottis, à côté des bâtonnets rouges en grande majorité. C'est à cause d'une mauvaise pénétration des couleurs ou pour des raisons toutes extrinsèques que ce phénomène se produit.

Jegian et J. Kurung [8] disent que dans les frottis la membrane bacillaire est lésée, de sorte qu'elle ne peut plus retenir la couleur rouge. Ils se laissent décolorer par les acides et recolorer par le bleu de méthylène.

Dans les colonies entières colorées au Ziehl-Neelsen *in situ*, nous n'avons jamais vu de bacilles bleus, quoique nous ayons vu des colonies pas plus âgées que de quarante-huit à quatre-vingt-seize heures. Si le mûrissement était un phénomène constant, nécessaire pour qu'un bacille jeune bleu devint rouge, on devrait trouver ces bacilles bleus dans toutes les colonies qui croissent. *Comme ceci n'est pas le cas, on n'est pas en droit d'admettre la non acido-résistance comme une phase de développement normal du bacille de Koch.*

Comme la forme et la structure du bacille de Koch que l'on trouve dans l'expectoration, le pus et les tissus tuberculeux sont identiques à celles des bacilles de nos cultures, nous avons le droit de penser que dans le milieu vivant, le bacille croît et se multiplie de la même façon que dans le milieu de culture. Notre supposition est corroborée par le fait que l'on rencontre dans le matériel humain des fragments de colonies en forme de palissade qui ont la même structure que nos colonies : ce sont des rangées parallèles de bâtonnets acido-résistants fragmentés.

CONCLUSIONS.

1° Le bacille de Koch se multiplie de deux manières : le bâtonnet se divise directement, le granule noir libre doit d'abord germer.

2° Le protoplasme du bâtonnet rouge bordeaux au Ziehl-Neelsen

est presque toujours fragmenté. La fragmentation est l'expression morphologique de la division transversale directe.

3° Lorsque le protoplasme bacillaire est concentré en granules qui se colorent métachromatiquement en bleu foncé (noir), ces granules, tant qu'ils restent intrabacillaires, ne doivent pas germer, mais peuvent redevenir rouge bordeaux et recommencer à se diviser directement. Lorsqu'ils sont devenus libres, par la déhiscence de la membrane, ils doivent germer, et après que la taille de la pousse a atteint une certaine grandeur, le protoplasme et la membrane s'y différencient. Alors, le protoplasme recommence à se diviser directement.

4° Les colonies, après cinq jours, ont déjà la forme de cordons constitués par des lignes de bâtonnets acido-résistants.

5° Quand les bacilles se développent dans le milieu de Buc ou de Löwenstein, ils sont acido-résistants à tous les moments de la multiplication.

6° Dans les frottis de tous les milieux à l'œuf stériles, ainsi que dans ceux à la pomme de terre glycinée et de Buc, on trouve souvent des images de granules et de bâtonnets non acido-résistants et même, parfois, de bâtonnets acido-résistants.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] JEYREM NEDELKOVITCH. *Variations biologiques du bacille de Koch*. Rapport à la IX^e Conférence de l'Union Internationale contre la tuberculose, Varsovie, 1934.
- [2] JEYREM NEDELKOVITCH. *Ces Annales*, 1936, **57**, 171.
- [3] HU (K.). *Jap. J. exp. Med.*, 1936, **14**, 29.
- [4] BRETEY (J.) et BROWAEYS (J.). *Ces Annales*, 1945, **71**, 331.
- [5] IMSENECKY. *Mikrobiologija*, 1945, **14**, 65.
- [6] LEMBKE et RUSKA. *Klin. Wochenschr.*, 1940, 19.
- [7] HAUDUROY (P.). *Le problème des tuberculoses atypiques*, 1946, 349-374. Masson et C^{ie}, Paris ; F. Roth et C^{ie}, Lausanne. — Id. *Rev. Tub.*, 1939, n^o 2.
- [8] DIVAN JEGIAN et KURUNG (J.). *Am. Rev. Tub.*, juillet 1947.
- [9] GERNEZ-RIEUX, SEVIN (A.) et SPY (Cl.). *Ann. de l'Inst. Pasteur de Lille*, 1948, I, 175.
- [10] POLITOVA (E. J.) et TRIOUSSE (M. V.). *La Presse Méd.*, 12 oct. 1935, 1585.
- [11] ROSENTHAL (S. R.). *I^{er} Congrès du BCG*. Paris-Lille 1948.
- [12] BERGERON (A.) et MÉZIÈRE (M^{lle} B. F.). *Rev. Tub.*, 1937, n^o 5.
- [13] COSTIL (L.). *Diagnostic bactériologique de la tuberculose par la culture*. Thèse. Le François, Paris, 1935.

ETUDES SUR LE COLLAGÈNE

IV. — EVALUATION DE L'ACTIVITÉ COLLAGÉNASIQUE DE LA TOXINE *PERFRINGENS*

par MAYLIS GUILLAUMIE, SLAVA MRCHEVITCH, MARCELLE DELAUNAY
et G. BECOULET (*).

(Institut Pasteur.)

Une toxine est caractérisée : par sa *dose minima active* sur chacun des substrats étudiés (hématies, gélatine, lécithine, etc.) ; par son *pouvoir de combinaison* à un antisérum, c'est-à-dire par la dose que neutralise chaque anticorps présent dans une quantité déterminée d'un immunosérum.

Parmi les nombreuses substances que la toxine *perfringens* est capable d'attaquer, nous n'envisagerons ici que le collagène A, préparé selon la technique de J. Nageotte et L. Guyon [1] ; nous avons signalé récemment que ce collagène purifié convient parfaitement à la recherche des collagénases microbiennes [2, 3]. C'est en présence d'un tel collagène que nous avons évalué, au cours du travail actuel, l'activité de différentes préparations de toxine *perfringens*.

I. — DOSE MINIMA COLLAGÉNASIQUE D'UNE TOXINE.

Une définition conventionnelle de la dose minima active d'une toxine sur le collagène — ou dose minima collagénasique (D. M. C.) de cette toxine — n'existe pas encore ; aussi, la source de collagène employée dans le titrage de la toxine, la quantité de collagène mise en œuvre, la durée d'action de l'enzyme sur le substrat, varient généralement avec les expérimentateurs.

Dans nos essais, nous nous sommes efforcées d'utiliser des pastilles de collagène A de 0,240 à 0,260 mgr., récemment préparées. Nous avons noté la plus petite dose de toxine qui lyse appréciablement une pastille de collagène A en vingt-quatre heures à 37° et aussi la plus petite dose de toxine qui dissout totalement ou presque totalement cette pastille en quarante-huit heures à 37°. Faisons remarquer que la quantité de toxine qui, à 37°, produit

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 octobre 1949.

en vingt-quatre heures un effet collagénasique décelable, ne détermine généralement pas la disparition totale de la pastille de collagène dans les vingt-quatre heures qui suivent.

Nos pastilles de collagène A sont conservées à l'état sec ; dix à vingt heures avant de déterminer la dose minima collagénasique d'une toxine, elles sont mises dans l'éther ; juste avant le titrage, elles sont retirées une à une de l'éther et lavées à l'eau physiologique.

Nous avons examiné des filtrats de culture de *Cl. perfringens* type A et des toxines *perfringens* des types B, C, D, E précipitées par le sulfate neutre d'ammonium : nous avons déterminé leur dose minima active sur le collagène A ainsi que leur pouvoir de combinaison à l'anti-collagénase des sérums anti-*perfringens* A, C, D.

Nos différentes souches de *Cl. perfringens* ont été cultivées dans du bouillon Vf additionné de 1 p. 1.000 de glucose et parfois de 1,5 p. 1.000 de sang desséché. Dans certains cas, des fragments de foie cuit ont été ajoutés au bouillon Vf glucosé.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES RÉALISÉES

POUR ÉVALUER LA DOSE MINIMA COLLAGÉNASIQUE D'UNE TOXINE.

Pour diluer les filtrats ou dissoudre les toxines précipitées, nous avons employé comparativement :

- a) De l'eau physiologique ordinaire ;
- b) De l'eau physiologique additionnée de 0,3 p. 100 de phénol ;
- c) De l'eau physiologique tamponnée à pH 6,5 par des phosphates ;
- d) De l'eau physiologique additionnée de phosphates et de 0,3 p. 100 de phénol. Ce tampon phéniqué, nous le préférons à l'eau physiologique ordinaire dont le pH est inconstant. Comme phosphates, nous prenons le monopotassique et le disodique ; nous préparons des solutions $\frac{M}{15}$ avec de l'eau distillée additionnée de 9 p. 1.000 de ClNa. Nous ajoutons 68 cm³ de la solution de phosphate monopotassique à 32 cm³ de la solution de phosphate disodique pour avoir un mélange de pH égal à 6.5.

1° TITRAGE D'UNE TOXINE FILTRÉE. — Nous décelons rapidement l'ordre de grandeur de l'activité du filtrat en introduisant respectivement dans quatre tubes : 1 cm³, 0,1 cm³, 0,01 cm³, 0,001 cm³ de filtrat ; dans les trois derniers tubes, nous ajoutons du tampon phéniqué pour que le volume soit de 1 cm³ comme dans le premier. Après avoir mis une pastille de collagène A dans tous les tubes, nous portons ceux-ci dans une étuve à 37° ; nous les examinons deux heures plus tard et au bout de vingt-quatre et qua-

rante-huit heures. Nous repérons ainsi les doses totalement inefficaces.

Au cours d'un deuxième titrage, nous recherchons la dose minima active du filtrat telle que nous l'avons définie et nous la contrôlons par un troisième titrage. Le tableau ci-dessous indique les dilutions effectuées pour titrer un filtrat dont la dose minima collagénasique est comprise entre 0,01 et 0,001 cm^3 ; c'est le cas d'un filtrat moyennement collagénasique.

NUMÉRO des tubes	DOSE DE TOXINE <i>perfringens</i>				TAMPON phéniqué (cm^3)
1	0,02	cm^3	(= 0,2 cm^3 d'un filtrat dilué à 1/10).		0,8
2	0,01	cm^3	(= 0,1 — — — 1/10).		0,9
3	0,008	cm^3	(= 0,8 — — — 1/100).		0,2
4	0,006	cm^3	(= 0,6 — — — 1/100).		0,4
5	0,004	cm^3	(= 0,4 — — — 1/100).		0,6
6	0,002	cm^3	(= 0,2 — — — 1/100).		0,8
7	0,001	cm^3	(= 0,1 — — — 1/100).		0,9
8	0,0008	cm^3	(= 0,8 — — — 1/1000).		0,2

Les doses décroissantes de toxine sont réparties dans 8 tubes (diamètre intérieur : 9 à 10 mm.) et additionnées d'une quantité suffisante de tampon phéniqué pour que le volume du liquide, dans chaque tube, soit de 1 cm^3 . Après introduction d'une pastille de collagène A dans chaque mélange, les tubes sont mis à l'étuve à 37°. L'aspect des pastilles est toujours noté au bout de vingt-quatre et quarante-huit heures et très fréquemment pendant trois, quatre et cinq jours pour voir progresser l'action enzymatique de faibles doses de collagénase.

2° TITRAGE D'UNE TOXINE PRÉCIPITÉE. — La toxine est dissoute dans le tampon phéniqué à raison de 1 mg. de toxine par centimètre cube de tampon. La solution est centrifugée. Pour fixer l'ordre de grandeur de son activité, elle est utilisée, au cours d'un titrage préliminaire, aux doses de 1 cm^3 , 0,1 cm^3 , 0,01 cm^3 , 0,001 cm^3 (ces quantités de solution contiennent respectivement : 1 mg., 0,1 mg., 0,01 mg., 0,001 mg. de toxine). Le volume du liquide est amené dans tous les tubes à 1 cm^3 avec du tampon phéniqué. Une pastille de collagène est introduite dans les tubes. Les résultats sont notés après deux, vingt-quatre et quarante-huit heures d'étuve à 37°. Les titrages suivants, destinés à préciser la D. M. C., sont conduits comme ceux d'un filtrat.

3° RÉSULTATS. — En adoptant cette technique de dosage, nous avons constaté qu'au bout de quarante-huit heures à 37° la dis-

solution totale d'une pastille de collagène pouvait être déterminée par 0,002 cm³ d'un filtrat *perfringens* préparé avec la souche SS et par 0,02 mg. de la toxine précipitée E₄₇, préparée avec la souche Lechien.

II. — POUVOIR DE COMBINAISON DE LA COLLAGÉNASE PERFRINGENS A L'ANTI-COLLAGÉNASE PERFRINGENS.

1° EXPÉRIENCES AVEC LA TOXINE ET L'ANTITOXINE PERFRINGENS A. — Pour évaluer la teneur en antigène α de la toxine *perfringens* A, nous disposons actuellement de trois sérums étalons anti-*perfringens* A. Le premier a été proposé en 1931 par P. Hartley (1). Les deux derniers datent de 1942 ; l'un a été présenté par P. Hartley et D. G. Evans, l'autre par J. Ipsen. La solution glycinée de ces 3 étalons contient la même quantité d'antitoxine α : 20 unités par centimètre cube. L'étalon anglais de 1931 et l'étalon danois de 1942 sont comparables en outre par leur teneur en anti-hémolysine θ ; l'étalon anglais de 1942 ne contient que des traces d'antitoxine θ [4]. Dans l'exposé qui suit, nous appellerons étalon initial anglais l'étalon de 1931 : 1 unité d'antitoxine α est contenue dans 0,2660 mg. de ce sérum à l'état sec.

Rappelons que les symboles L +, LN et LH représentent les doses-test léthale, nécrosante et hémolytique de toute toxine titrée dans des conditions appropriées en présence d'un sérum étalon convenable. Dans le cas de la toxine *perfringens* A, la dose-test léthale correspond au poids de toxine qui, en mélange avec une unité étalon d'antitoxine α , tue dans les quarante-huit heures la moitié environ des souris de 17 à 20 g. que l'on injecte par voie veineuse. La dose-test nécrosante LN représente le poids de toxine *perfringens* A qui, additionné d'une unité anti- α provoque, vingt-quatre à quarante-huit heures après l'injection intradermique, une zone nécrosée jaune de 0,5 \times 0,5 mm. sur la peau épilée des cobayes blancs.

Ayant très peu de sérum étalon au début de la récente guerre mondiale, nous avons dû utiliser de petites quantités de sérum pour titrer nos différentes préparations de toxine *perfringens* A : c'est pourquoi nous avons recherché la dose LH/10 de ces toxines, c'est-à-dire le poids de toxine qui, en présence d'un dixième d'unité d'anti-hémolysine θ lyse en quatre heures à 37° la moitié environ des hématies lavées de mouton contenues dans

(1) La teneur en antitoxine α de ce sérum a été très soigneusement comparée à celle de l'étalon anti-*perfringens* A de Washington.

0,1 cm³ d'une suspension globulaire à 5 p. 100 [5]. Nous avons alors supposé que l'étalon initial anglais contenait 20 unités anti- θ par centimètre cube ; 0,1 unité anti- θ était donc présente dans 0,005 cm³ de cet étalon, c'est-à-dire dans 0,0266 mg. de l'étalon à l'état sec.

Nous avons appelé *Le* la dose-test lécithinasique d'une toxine, c'est-à-dire le poids de toxine dont l'effet lécithinasique est neutralisé par une unité anti- α . Puis, nous avons désigné par *Le/20 Ca* le poids de toxine qui, en présence de calcium et de 1/20 d'unité de sérum étalon anti-*perfringens*, détermine en dix-huit à vingt heures à 37° une opalescence légère dans 0,1 cm³ de sérum humain [6] ; en multipliant par 20 ce poids de toxine, on obtient un nombre qui concorde approximativement avec la valeur *Le* déterminée expérimentalement en présence de Ca et de sérum humain (2).

C. L. Oakley, C. H. Warrack et W. E. Van Heyningen [7] ont dénommé *K* la collagénase *perfringens*. Dans l'exposé qui suit, nous appelons *LK* la dose-test collagénasique d'une toxine ; nous la définissons ainsi : c'est le poids de toxine qui, en mélange avec 1 unité d'un sérum anti-*perfringens* pris comme étalon attaque légèrement en quarante-huit heures à 37° une pastille de collagène de 0,240 à 0,260 mg. Autrement dit, la dose *LK* représente le poids de toxine dont presque toute la collagénase est neutralisée par une unité du sérum étalon anti-collagénasique choisi.

Nous avons signalé précédemment que les 3 étalons anti-*perfringens* en usage en Europe sont comparables par leur teneur en antitoxine α et que l'un d'eux ne contient pratiquement pas d'anti-hémolysine θ ; ne sachant pas si ces 3 étalons renferment le même taux d'anti-collagénase et ignorant par conséquent s'ils peuvent être utilisés indifféremment pour déterminer la valeur *LK* d'une toxine *perfringens*, nous avons comparé leur activité anti-collagénasique avec l'intention d'adopter ensuite le plus riche en anti-collagénase pour titrer nos toxines (3).

(2) Ainsi, dans nos conditions expérimentales, un vingtième d'unité anti- α de sérum étalon neutralise l'effet lécithinasique de 0,055 mg. d'un de nos échantillons de toxine *perfringens* et une unité du même sérum en neutralise 0,94 mg. Expérimentalement, la dose *Le/20 Ca* d'un autre échantillon de toxine est égal à 0,38 mg. et la dose *Le* à 6,4 mg. Dans le cas d'un troisième échantillon, nous avons obtenu les résultats suivants : la dose *Le/20 Ca* = 0,19 mg. et la dose *Le* 3,8 mg.

(3) L'un de ces étalons devrait servir à définir l'unité anti-hyaluronidasique. Si l'on appelle μ l'hyaluronidase *perfringens*, on peut appeler $L\mu$ la dose-test hyaluronidasique, c'est-à-dire le poids de toxine qui en présence de l'unité étalon anti-hyaluronidasique attaque légèrement la mucine, le liquide synovial ou l'acide hyaluronique pur.

CHOIX D'UN SÉRUM ÉTALON POUR DÉTERMINER
L'ACTIVITÉ COLLAGÉNASIQUE D'UNE TOXINE *PERFRINGENS*.

Nous avons recherché si les 3 étalons anti-*perfringens* A sont capables, dans des conditions identiques, de neutraliser la même quantité de collagénase.

TECHNIQUE DES TITRAGES. — La toxine est dissoute dans le tampon phéniqué (pH 6,5), puis centrifugée.

Dans une première série de tubes nous mettons des doses décroissantes de la toxine à titrer et une dose fixe de sérum étalon anglais de 1931 : 0,05 cm³ ou, ce qui revient au même, 0,1 cm³ de cet étalon dilué à 1 p. 2 avec le tampon phéniqué ; nous amenons les mélanges à 1 cm³ avec du tampon phéniqué ; nous portons les tubes pendant quarante-cinq minutes à 37° ; dans chacun d'eux, nous mettons ensuite une pastille de collagène A, puis nous les plaçons à l'étuve. Nous les examinons au bout de deux heures, vingt-quatre et quarante-huit heures et souvent pendant cinq jours. Au cours du premier titrage, les quantités de toxine employées varient du simple au double. Dans les titrages suivants, elles diffèrent de 10 p. 100 environ.

Dans une deuxième série de tubes, préparée comme la première, nous remplaçons l'étalon de 1931 par l'étalon anglais de 1942.

Dans une troisième série de tubes, les doses décroissantes de toxine sont additionnées d'étalon danois dans les mêmes conditions que précédemment.

Les tubes des 3 séries sont examinés au même moment. Nous prenons, comme point final du titrage, le poids de toxine qui, en présence de 0,05 cm³ de chaque étalon, détermine en quarante-huit heures à 37° une lyse légère du collagène.

Nous avons titré successivement : les toxines *perfringens* E₃₇ et E₄₇, préparées avec la souche Lechien, l'une en 1939 et l'autre en 1947 ; les toxines ES₁₁ et ES₁₅, respectivement préparées en 1945 et 1947 avec la souche SS ; et, enfin, la toxine purifiée B₅₀₇H que nous a obligeamment donnée M^{lle} Bidwell. La méthode de purification de cette toxine est partiellement décrite dans un article récent de E. Bidwell et W. E. van Heyningen [8].

Les toxines E₃₇, E₄₇ et ES₁₅ contiennent de la lécithinase α et de grandes quantités d'hémolysine θ . La dose minima hémolytique (D.M.H.) de la toxine ES₁₅, en présence d'eau physiologique tamponnée à pH 6,5 par des phosphates, est en effet égale à 0,0004 cm³. La toxine ES₁₁, obtenue en ensemencant la souche SS dans du bouillon Vf additionné de 1 p. 1.000 de glucose et de fragments de foie cuit, contient beaucoup de lécithinase α mais pas d'hémolysine θ ; les antigènes α et θ n'existent qu'à l'état de traces dans la toxine purifiée B₅₀₇H.

**Titrage d'une toxine *perfringens*
en présence d'un sérum étalon anti-*perfringens* et de collagène A.**

QUANTITÉ de toxine E ₅₁₁ (solution à 2 mg. par centimètre cube)		SÉRUM étalon initial [dilué de moitié]	TAMPON phéniqué (cm ³)	INTENSITÉ de la destruction du collagène A (++++ : lyse complète) au bout de		
en mg.	en cm ³	(cm ³)		24 heures	48 heures	3 jours
2	1	0,1	0	+++	++++	++++
1,8	0,9	0,1	0	0	+±	+++
1,7	0,85	0,1	0,05	0	±	+
1,6	0,8	0,1	0,1	0	0	0
1,4	0,7	0,1	0,2	0	0	0
1,2	0,6	0,1	0,3	0	0	0
1,1	0,55	0,1	0,35	0	0	0
1	0,5	0,1	0,4	0	0	0

De l'ensemble de nos titrages, il ressort que l'étalon de 1931 est le plus anti-collagénasique des 3 étalons étudiés ; l'étalon anglais de 1942 est le plus pauvre en anti-collagénase. Ceci est nettement indiqué par les résultats que nous apportons dans le tableau suivant. Ce tableau montre en outre que nous avons, dans 2 cas, recherché le poids de toxine qui est neutralisé comparativement par 0,05 et 0,1 cm³ d'étalon. Voici, par exemple, les résultats du titrage de la toxine E₄₇ :

0,05 cm³ de l'étalon anglais de 1931 neutralise 1,2 mg. de la toxine E₄₇ ;
 0,05 cm³ de l'étalon danois de 1942 neutralise 0,55 mg. de la toxine E₄₇ ;
 0,03 cm³ de l'étalon anglais de 1942 neutralise 0,46 mg. de la toxine E₄₇ ;
 0,1 cm³ de l'étalon anglais de 1942 neutralise 0,27 mg. de la toxine E₄₇.

D'après le tableau suivant, 0,05 cm³ de l'étalon anglais de 1931 neutralise l'effet collagénasique de 0,035 mg. de toxine B₅₀₇II et 0,1 cm³ de cet étalon en neutralise 0,062 mg., le titrage étant fait en présence de collagène A dans les conditions que nous avons mentionnées. Dans les conditions expérimentales des auteurs anglais, la dose-test collagénasique de cette toxine, déterminée vis-à-vis de 2 unités arbitraires anti-collagénasiques, est de 0,05 mg. ou de 0,02 mg., suivant que l'évaluation est faite en présence de muscle ou d'azocoll. Ainsi, le résultat varie fortement avec le substrat utilisé dans le dosage. Il dépend naturellement aussi de la valeur de l'unité anti-collagénasique adoptée.

Nous avons déjà signalé que l'étalon anglais de 1931 sert à définir l'unité anti- α et l'unité anti- θ . Actuellement, nous le choisissons pour définir l'unité anti-K. Nous considérons que la solu-

**Activité anti-collagénasique comparée de 3 sérums anti-*perfringens*
(titrages en présence de collagène A).**

TOXINE <i>perfringens</i>	POIDS DE TOXINE en milligrammes neutralisé par 0,05 cm ³ de sérum			POIDS DE TOXINE en milligramme neutralisé par 0,1 cm ³ de sérum	
	Etalon anglais de 1931	Etalon danois de 1942	Etalon anglais de 1942	Etalon anglais de 1931	Etalon anglais de 1942
E ₃₇	5,25	2,5	0,7		
E ₄₇	1,2	0,55	0,16		0,27
ES ₄₄	1,7	1,1			
ES ₁₅	2,6	1,7			
B ₅₀₇ H	0,035			0,062	

tion glycinée préparée à Hampstead avec cet étalon titre, par centimètre cube, non seulement 20 unités anti- α et 20 unités anti- θ (3), mais encore 20 unités anti-K. Nous admettons par conséquent que 0,05 cm³ de cette solution contient à la fois 1 unité anti- α , 1 unité anti- θ et 1 unité anti-K. En outre, nous suggérons que cette même solution serve d'étalon, lorsque ce sera possible, pour fixer la valeur de tout autre anticorps anti-*perfringens*. Nous croyons logique, en effet, de *tenir compte de toutes les propriétés des premiers étalons anti-*perfringens** qui ont été acceptés comme étalons anti- α et de les comparer à celles des étalons qu'il y aura lieu de faire au fur et à mesure que le stock des premiers s'épuisera.

REMARQUES. — a) Dans la première partie de cet exposé, nous avons mentionné que 0,02 mg. de la toxine E₄₇ détruisent totalement une pastille de collagène en quarante-huit heures à 37°. La dose-test collagénasique LK de cette toxine étant égale à 1,2 mg., d'après le titrage avec l'étalon de 1931, elle contient donc 60 doses minima collagénasiques.

b) D'après nos observations [9], les fragments de foie cuit

(3) Récemment, A. Sordelli, A. Mazullo, N. Niola, J. Ferrari et C. Désimone (1948) ont proposé comme unité anti- θ , l'activité de l'antitoxine contenue dans 0,0006 g. de sérum desséché neutralisant au moins 30 D.M. souris [10].

Au cours du même travail, les auteurs signalent que les sérums anti-*perfringens* qui contiennent à la fois les antitoxines α et θ protègent mieux les animaux contre l'infection à *W. perfringens* que les sérums contenant seulement l'antitoxine α ; nous avons formulé une telle conclusion en 1944 [11].

ajoutés au bouillon VI glucosé empêchent souvent les souches SS et Lechien de produire de l'hémolysine θ . La toxine ES₁₁, exemple d'hémolysine θ , a été préparée avec la souche SS et avec du bouillon VI glucosé, additionné de foie ; elle contient une forte proportion de collagénase puisque la dose I.K. est égale à 1,7 mg. Les fragments de foie n'ont donc pas sur l'élaboration de la collagénase l'effet inhibiteur qu'ils manifestent à l'égard de la toxine θ . Nous nous proposons même de rechercher si le foie introduit dans le bouillon VI intensifie la formation des collagénases bactériennes.

2° EXPÉRIENCES AVEC LES TOXINES ET LES ANTITOXINES PERFRINGENS B, C, D, E. — a) *Toxines perfringens B, C, D, E.* — C. L. Oakley, C. H. Warrak et W. E. van Heyningen ont recherché si les filtrats des cultures de *Cl. perfringens* des types B, C, D détruisent l'azocoll [7]. Reprenant ces essais, et les amplifiant, C. L. Oakley, C. H. Warrack et M. Warren [12] ont fait agir *in vitro* de nombreux filtrats sur de l'azocoll, sur de la poudre de peau, sur du « papier de collagène » ou sur des fragments de muscle frais ; ces auteurs ont conclu de leurs recherches comparatives que l'azocoll et la poudre de peau ne sont pas des indicateurs convenables pour les collagénases, parce qu'ils sont attaqués par des enzymes ne dissolvant pas le collagène ; d'après eux, le « papier de collagène » est spécifique, mais relativement peu sensible. Au sujet des propriétés des filtrats étudiés, C. L. Oakley, C. H. Warrack et M. Warren ont mentionné que *Cl. perfringens* type B ne produit pas de quantités mesurables de collagénase, alors que les types C et E en élaborent ainsi que diverses souches de *Cl. perfringens* D.

Ainsi que nous l'avons dit, le collagène A est un indicateur fidèle de l'activité collagénasique de tout filtrat soumis à l'examen [2, 3, 13] : en mettant des filtrats de culture de *Cl. perfringens* C et E en contact avec des pastilles de collagène A, nous avons, en effet, tout aussi facilement décelé l'effet collagénasique de ces liquides que celui des filtrats des cultures de *Cl. perfringens* A ou de *Cl. histolyticum* ; nos souches de *Cl. perfringens* D qui se sont avérées capables *in vivo* de transformer en une pulpe molle les muscles de la cuisse d'un cobaye infecté expérimentalement en cette région ont élaboré *in vitro* une collagénase très active sur le collagène A.

b) *Antitoxines perfringens C, D, E.* — C. L. Oakley, C. H. Warrack et M. Warren [12] ont mis en évidence que les anti-sérums des *Cl. perfringens* A, C, D, E neutralisent *in vitro* la collagénase des filtrats *perfringens* de type A (expériences en présence de fragments de muscle).

En effectuant une série d'essais de neutralisations croisées, en

présence de collagène A et de doses variables de sérums anti-*perfringens* dilués soit avec de l'eau physiologique soit avec du tampon phéniqué, nous avons aisément constaté que les sérums anti-*perfringens* C et anti-D, tout comme les sérums anti-*perfringens* A, neutralisent la collagénase de *Cl. perfringens* A : 5 doses minima collagénasiques de toxine *perfringens* A ont été inhibées par 0,04 cm³ de l'un de nos sérums anti-*perfringens* C et par 0,005 cm³ d'un sérum anti-*perfringens* D.

Nous avons en outre observé les faits suivants :

1° Les sérums anti-*perfringens* A et anti-D, tout comme les sérums anti-*perfringens* C, neutralisent l'effet collagénasique de la toxine *perfringens* C (dans ces recherches nous avons utilisé 2 doses minima collagénasiques de toxine C et comme doses de sérums, 1/50 et 1/100 cm³ de sérum anti-A, anti-C ou anti-D).

2° L'action collagénasique de la toxine élaborée par l'une de nos souches myolytiques de *Cl. perfringens* D est inhibée non seulement par les sérums anti-D, mais encore par les sérums anti-A et anti-C : 1/100 cm³ de chacun de ces sérums a empêché 1 dose minima collagénasique de cette toxine de dissoudre le collagène A.

Dans toute cette série d'essais, nous avons utilisé des immun-sérums de chevaux et nous avons pris comme valeur de la dose minima collagénasique des toxines, la dose qui, en quarante-huit heures à 37°, solubilise totalement une pastille de collagène A.

Résumé : Les sérums étalons anti-*perfringens* A, proposés en 1931 et en 1942 pour évaluer la teneur en antigène α de la toxine *perfringens*, ont des titres anti-collagénasiques différents, d'après les déterminations faites en présence de collagène A. Le sérum étalon de 1931 est plus riche en anti-collagénase que les étalons de 1942 ; il pourrait être utilisé pour définir l'unité anti-collagénasique K. Cette unité correspondrait à l'activité que possède 0,2660 mg. du sérum anti-*perfringens* utilisé comme étalon anti- α depuis 1931.

Les sérums anti-*perfringens* A et anti-D inhibent l'action collagénasique de la toxine *perfringens* C ; les sérums anti-*perfringens* A et anti-C inhibent l'action collagénasique de la toxine *perfringens* D.

BIBLIOGRAPHIE.

- [1] Arch. Biol., 1930, **41**, 1.
- [2] Ces Annales, 1949, **76**, 16.
- [3] Ces Annales, 1949, **77**, 220.
- [4] Ces Annales, 1946, **72**, 651.
- [5] Ces Annales, 1941, **66**, 329.
- [6] Ces Annales, 1946, **72**, 384.
- [7] J. Path. a. Bact., 1946, **58**, 229.

- [8] *Biochem. J.*, 1948, **42**, 140.
- [9] *Ces Annales*, 1942, **68**, 513 ; *ibid.*, 1944, **70**, 86.
- [10] *Rev. Inst. Bact. C. Malbran.*, 1944, **42**, 390.
- [11] *Ces Annales*, 1944, **70**, 332.
- [12] *J. Path. a. Bact.*, 1948, **60**, 495.
- [13] *Ces Annales*, 1949, **77**, 603.

DÉTERMINATION DU TITRE ANTI-COLLAGÉNASIQUE DES SÉRUMS ANTI-PERFRINGENS

PAR MAYLIS GUILLAUMIE, SLAVA MRCHEVITCH, MARCELLE DELAUNAY
et G. BECOULET (*).

(Institut Pasteur.)

En 1946, C. L. Oakley, G. H. Warrack et W. E. van Heyningen dénomment *K* la collagénase *perfringens* et déterminent, en présence de divers filtrats de toxine *perfringens* A, l'activité anti-collagénasique d'un grand nombre de sérums anti-*perfringens* [4]. L'activité de tous les sérums est comparée à celle du sérum R. 8531 auquel les auteurs anglais attribuent la valeur arbitraire de 180 « unités » anti-collagénasiques (1) : les mélanges de toxine et de sérum sont additionnés de « papier collagène », d'azocoll ou de petits morceaux de muscles de la paroi abdominale d'un cobaye fraîchement tué ; les résultats sont notés lorsque les sérums sont restés pendant la nuit à 37° en contact avec le filtrat *perfringens* et l'indicateur de la collagénase.

Depuis 1931, la teneur en antitoxine α des sérums anti-*perfringens* est confrontée à celle du sérum étalon proposé par P. Hartley [2]. Rappelons que une unité anti- α est contenue dans 0,2660 mg. de cet étalon à l'état sec et que la solution glycinée que l'Institut national de Hampstead prépare avec cet étalon titre 20 unités anti- α par centimètre cube.

Après avoir constaté que la solution glycinée du sérum étalon de P. Hartley était riche en anti-collagénase, il nous a paru indiqué de l'adopter comme étalon anti-collagénasique : nous avons admis qu'elle contenait 20 unités anti-collagénasiques *K* par centimètre cube [3] ; nous avons donc choisi comme unité anti-*K*, l'activité de l'anti-collagénase présente dans 0,05 cm³ de cette solution, c'est-à-dire l'activité anti-collagénasique de 0,2660 mg. du sérum sec de 1931. Ceci étant posé, il nous a suffi ensuite, pour évaluer le titre anti-collagénasique d'un sérum anti-*perfringens* A, de déceler le plus petit volume de ce sérum qui exerce le même effet anti-collagénasique que 0,05 cm³ de la solution pré-

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 octobre 1949.

(1) Le sérum R 8531 titre en outre 170 unités internationales anti- α et 90 unités anti-0.

parée avec l'étalon anglais de 1931. Nos premiers titrages ont été effectués en présence de morceaux de muscles de cobaye ; tous les autres en présence de collagène A, de préparation récente. Dans un travail précédent nous avons donné le mode d'obtention de ce collagène [4].

MÉTHODE PERSONNELLE DE DÉTERMINATION DU TITRE ANTI-COLLAGÉNASIQUE DES SÉRUMS ANTI-PERFRINGENS.

Pour rechercher le titre anti-collagénasique d'un sérum vis-à-vis d'une toxine donnée, nous utilisons comme *dose d'épreuve de toxine*, la dose dont l'effet collagénasique est presque totalement empêché par 0,05 cm³ de l'étalon anglais, c'est-à-dire la *dose-test collagénasique LK* de cette toxine [3].

La toxine est dissoute dans de l'eau physiologique phéniquée et tamponnée à pH 6,5 par des phosphates (nous avons indiqué le mode de préparation de ce tampon dans la précédente note). La solution de la toxine est utilisée après centrifugation. Le sérum à titrer est amené aux dilutions voulues avec le tampon phéniqué. Au cours du premier titrage, les doses de sérum essayées varient de 50 p. 100 pour avoir rapidement une idée de l'ordre de grandeur du titre anti-collagénasique ; dans les titrages suivants, elles diffèrent de 10 p. 100 environ.

Dans une série de tubes de 9 à 10 mm. de diamètre intérieur, nous mettons les doses décroissantes du sérum à titrer, la dose d'épreuve de toxine et assez de tampon phéniqué pour amener le volume de tous les mélanges à 1 cm³. Les tubes sont maintenus pendant quarante-cinq minutes à 37°. Une pastille de collagène de 0,240 à 0,260 mg. est alors introduite dans chacun d'eux. Les tubes sont remis à 37°, regardés au bout de deux heures, vingt-quatre heures, quarante-huit heures et souvent même le troisième, le quatrième et le cinquième jour, pour suivre le devenir du collagène ; mais le titre du sérum est noté lorsque les tubes ont séjourné pendant *quarante-huit heures* à 37° : nous prenons, à ce moment-là, comme point final du titrage, le plus petit volume de sérum en présence duquel la dose d'épreuve de toxine ne détermine à 37° qu'une lyse légère du collagène A.

RÉSULTATS. — Pour évaluer, comme nous venons de le décrire, le titre anti-collagénasique de plusieurs de nos sérums anti-*perfringens* A (purifiés ou non), nous avons utilisé 5 échantillons de toxine *perfringens* : les toxines E₃₇ et E₄₇ préparées avec la souche Lechien, les toxines ES₁₁ et ES₁₅ préparées avec la souche SS et la toxine purifiée B₅₀₇H qui nous a été offerte par M^{lle} Bidwell.

Dans le but de comparer l'« unité » anti-collagénasique adoptée par C. L. Oakley, G. H. Warrack et W. E. van Heyningen, à l'unité anti-K que nous avons choisie, nous avons titré le sérum Ex 1044 que M. Oakley a eu l'amabilité de nous envoyer en janvier 1948. A cette date, le sérum Ex 1044 titrait 380 unités anti- α , 12 unités anti- θ et M. Oakley indiquait sa valeur anti-collagénasique par le nombre 500. Nous avons conservé ce sérum à la température de 2°. En recherchant récemment son titre anti-lécithinasique par notre procédé [5], nous avons constaté qu'il titre actuellement 360 unités anti- α . La teneur en antitoxine α de ce sérum n'a donc pratiquement pas varié en dix-huit mois.

Dans le tableau I, nous indiquons quelques-unes des doses de

TABLEAU I. — Recherche du titre anti-collagénasique de différents sérums anti-perfringens.

TOXINE employée dans le titrage	DOSE d'épreuve de toxine [dose LK] (mg)	NUMÉRO du sérum	VOLUME de sérum utilisé (cm ³)	INTENSITÉ de la destruction du collagène au bout de			
				24 heures	48 heures	3 jours	4 jours
E ₃₇	5,25	716	1/100 1/110	0 0	0 +	0 ++	0 ++
E ₄₁	1,7	716	1/100 1/110 1/125	0 + +++	0 + ++++		
E ₄₇	1,2	1202	1/100 1/110	0 +++	0 ++++	0 ++++	0 ++++
ES ₁₁	1,7	1202	1/90 1/100	0 +	0 ++++	0 ++++	0 ++++
B ₅₀₇ H	0,035	1202	1/90 1/100	0 +++	0 ++++	0 ++++	0 ++++
E ₄₇	1,2	Etalon.	1/20	0	+	++	
E ₄₇	1,2	Ex 1044	1/180 1/200	0 0	0 ±	0 +	
ES ₁₁	1,7	Ex 1044	1/180 1/200 1/225	0 ± ++++	0 +++± ++++	0 ++++ ++++	++ ++++ ++++
B ₅₀₇ H	0,035	Ex 1044	1/200 1/225 1/250	0 0 ++++	0 0 ++++		

0, pas de destruction du collagène; +++, destruction totale du collagène.

sérum que nous avons ajoutées à différentes préparations de toxine *perfringens* et, en outre, l'intensité de la lyse du collagène observée pendant un à quatre jours. De ce tableau, nous analyserons les résultats suivants :

A la dose de $1/100 \text{ cm}^3$, le sérum 716 empêche totalement l'effet collagénasique de la dose-test LK des toxines E_{37} et ES_{11} . A la dose de $1/110 \text{ cm}^3$, il laisse persister un léger effet collagénasique de ces toxines ; cet effet est visible au bout de vingt-quatre heures d'étuve dans le titrage avec la toxine ES_{11} et n'augmente pas pendant les vingt-quatre heures suivantes ; la lyse du collagène n'apparaît qu'au bout de quarante-huit heures lorsque le titrage est fait avec la toxine E_{37} .

Le sérum 1202, à la dose de $1/100 \text{ cm}^3$, inhibe totalement la dose d'épreuve de la toxine E_{47} ; à la dose de $1/110 \text{ cm}^3$, il ne neutralise pas toute cette toxine : la collagénase non neutralisée détruit totalement la pastille de collagène en moins de vingt-quatre heures. Ce même sérum doit être utilisé à la dose de $1/90 \text{ cm}^3$ pour inhiber la collagénase des toxines ES_{11} et $B_{507}H$; à la dose de $1/100 \text{ cm}^3$, il n'empêche pas ces toxines de dissoudre le collagène employé : la lyse est totale en quarante-huit heures. Ainsi donc, le titrage du sérum 1202 avec les toxines ES_{11} et $B_{507}H$ fournit des résultats très concordants. Le sérum Ex 1044, par contre, présente appréciablement moins d'affinité pour la toxine ES_{11} que pour la toxine $B_{507}H$ puisqu'il faut $1/180 \text{ cm}^3$ de ce sérum pour inhiber la dose d'épreuve de la toxine ES_{11} et qu'il suffit de $1/225 \text{ cm}^3$ de sérum pour produire le même effet vis-à-vis de la toxine $B_{507}H$.

A la suite de ces observations, nous inscrivons comme valeur anti-K du sérum 716, le titre de 110 unités lorsque le dosage est fait avec les toxines E_{37} et ES_{11} ; nous notons que le sérum 1202 titre entre 90 et 100 unités anti-K, que la détermination soit effectuée avec la toxine ES_{11} ou avec la toxine $B_{507}H$. Ajoutons que le titrage de ces deux sérums, après purification par digestion peptique, ne présente aucune difficulté.

Le sérum Ex 1044 titre entre 225 et 250 unités, d'après le dosage fait avec la toxine $B_{507}H$, les résultats étant notés après vingt-quatre ou quarante-huit heures d'étuve. Les lectures faites après vingt-quatre heures d'étuve tendent à indiquer que ce même sérum titre 200 unités en présence de la toxine ES_{11} ; d'après les lectures faites au bout de quarante-huit heures, il en contiendrait moins de 200. Il titre sûrement plus de 180 unités anti- ES_{11} (tableau I) ; aussi inscrivons-nous comme titre : 180 à 200 unités anti-K vis-à-vis de la toxine ES_{11} .

En utilisant d'autres sérums, il nous est arrivé de constater quelquefois encore que les résultats inscrits après quarante-huit heures d'étuve différaient *nettement* des lectures faites vingt-

TABLEAU II. — Titre anti-collagénasique de différents sérums anti-*perfringens* (titrages en présence de collagène A et d'une dose-test LK de diverses toxines *perfringens*).

SÉRUM ANTI- <i>perfringens</i>	TITRE ANTI- <i>K</i> vis-à-vis des toxines <i>perfringens</i>			
	E ₃₇	E ₄₁	ES ₄₁	E ₅₀₇₁₁
716	110	115	110	
1202		100 à 110	90 à 100	90 à 100
Ex 1044		200	180 à 200	225 à 250
Dose-test collagénasique LK (en mg.)	5,25	1,2	1,7	0,035

quatre heures plus tôt (2). Il est possible que ceci résulte de la dissociation tardive du complexe collagénase + anti-collagénase : l'action de la collagénase ainsi libérée s'ajouterait à celle de la petite quantité de collagénase qui n'aurait pas été neutralisée par suite d'un manque d'anti-collagénase. Cette dissociation éventuelle est peut-être, dans certains cas, une cause d'erreur dans la notation des résultats. Nous avons cependant laissé systématiquement tous les mélanges de toxine, de sérum et de collagène pendant quarante-huit heures à 37° avant de noter le titre des sérums, de peur d'inscrire des titres trop élevés. Mais nous nous proposons de rechercher des conditions qui permettraient de diminuer l'irrégularité des résultats que l'on observe quelquefois tardivement lorsqu'on évalue le titre anti-collagénasique de certains sérums anti-*perfringens* en présence de différentes toxines *perfringens*.

Examinons les résultats de nos titrages à un autre point de vue : le sérum 716 titre 110 unités anti-*K* vis-à-vis des toxines E₃₇ et ES₁₁ ; son titre anti-0 est de 1.600 unités. La toxine E₃₇

(2) Au cours de nos recherches sur l'évaluation de l'activité anti-hémolytique 0 des sérums anti-*perfringens*, nous avons quelquefois observé un phénomène analogue : une hémolyse tardive se produit parfois dans les tubes contenant de faibles doses de sérum, de sorte que les résultats inscrits à vingt-quatre heures d'intervalle diffèrent appréciablement [6]. D'après C. L. Oakley et C. H. Warrack [7], le pouvoir de combinaison de la toxine α avec l'antitoxine α , déterminé *in vitro* en présence d'hématies, est augmenté par les ions Ca et Mg. En injectant par voie veineuse à des souris des mélanges de toxines et d'antitoxines *perfringens*, nous avons pu constater aussi que le Ca intensifiait l'action antitoxique de certains sérums anti-*perfringens* vis-à-vis de quelques toxines très hémolytiques.

contient beaucoup d'hémolysine θ ; la toxine ES_{11} en est dépourvue. L'anti-hémolysine θ du sérum 716 entre en réaction avec l'hémolysine θ de la toxine E_{37} ; par contre, elle reste totalement inemployée dans les titrages avec la toxine ES_{11} . Ces observations montrent qu'un excès d'anti-hémolysine θ n'influence nullement la détermination du titre anti- K .

Le sérum 1202 titre entre 90 et 100 unités anti- K d'après les titrages avec les toxines ES_{11} et $B_{507}H$. La première de ces toxines contient beaucoup d'antigène α ; la deuxième, à peine. L'antitoxine α présente dans 1/90 de centimètre cube de sérum 1202 suffit à neutraliser l'antigène α de la première toxine; elle reste telle quelle dans le titrage avec la toxine $B_{507}H$. L'antitoxine α , de même que l'anti-hémolysine θ , ne perturbe donc pas la réaction de neutralisation de la collagénase par l'anti-collagénase.

En poursuivant le même raisonnement on peut envisager, d'une part, qu'un excès d'antitoxine α n'influence pas non plus le titrage du sérum Ex 1044 avec la toxine $B_{507}H$ et, d'autre part, que l'hémolysine θ présente dans les tubes contenant ce sérum et la toxine E_{47} ne gêne pas l'évaluation de l'activité anti-collagénasique d'un sérum. Les résultats du tableau II montrent que ce sérum titre 200 unités anti- K vis-à-vis de la toxine E_{47} et entre 225 et 250 unités vis-à-vis de la toxine $B_{507}H$. Ainsi que nous l'avons dit, nous avons noté que ce sérum titre seulement 180 à 200 unités vis-à-vis de la toxine ES_{11} . Signalons ici que dans les titrages réalisés par C. L. Oakley et ses collaborateurs il existe aussi des écarts de cet ordre et même de plus importants entre les résultats des titrages effectués en présence de différents filtrats *perfringens* et de muscles de cobaye.

La teneur en antitoxine α du sérum Ex 1044 n'a pas sensiblement baissé en dix-huit mois. Si la teneur en anti-collagénase ne s'est pas non plus notablement affaiblie pendant le même temps, la valeur anti-collagénasique de ce sérum doit être voisine de la valeur 500 indiquée en 1948 par C. L. Oakley. Ce sérum, d'après nos dosages actuels, contient moins de 250 unités anti- K . Il semble donc que l'unité anti- K que nous avons définie est plus forte que l'« unité » des auteurs anglais. Mais on ne peut exclure la possibilité d'une atténuation de l'anti-collagénase du sérum envisagé; comme, d'autre part, le titre peut varier avec les échantillons de toxine employés dans le titrage et avec le mode de notation des résultats, la valeur moyenne du rapport entre l'« unité » anti-collagénasique anglaise et l'unité anti- K ne pourra être donnée qu'après avoir effectué d'autres titrages.

RÉSUMÉ. — En utilisant différents échantillons de toxine *perfringens* pour déterminer, en présence de collagène A et d'eau physiologique tamponnée par des phosphates, le titre anti-colla-

génasique d'un même sérum anti-*perfringens*, on obtient souvent des résultats concordants ; parfois les résultats des titrages diffèrent de 20 p. 100.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *J. Path. a. Bact.*, 1946, **58**, 229.
- [2] Société des Nations. Rapport de l'Organisation d'Hygiène. Rapport de la Commission permanente de standardisation biologique. Numéro officiel. C. H. 1056 (1) Londres, 23 juin 1931, p. 13.
- [3] *Ces Annales*, 1950, **78**, 200.
- [4] *Ces Annales*, 1949, **76**, 16.
- [5] *Ces Annales*, 1946, **72**, 384.
- [6] *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 45.
- [7] *J. Path. a. Bact.*, 1941, **53**, 335 ; *Bull. Hyg.*, 1943, **48**, 781.
- [8] *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 1168.

MILIEUX SEMI-SYNTHÉTIQUES A L'ALBUMINE POUR LA CULTURE DES BACILLES TUBERCULEUX

par RENÉ DUBOS et HENRIETTE NOUFFLARD.

(*Rockefeller Institute for Medical Research.*)

Nous nous proposons de résumer ici les techniques de cultures du bacille de Koch que nous avons mises au point au Rockefeller Institute. Nous ne reviendrons pas sur les bases théoriques de ces méthodes qui ont déjà été exposées dans une série de mémoires [1-5, 7, 8] et nous nous contenterons d'en présenter les conclusions.

Toutes les souches de bacilles tuberculeux que nous avons étudiées se développent abondamment dans des milieux synthétiques renfermant, comme seule source de carbone et d'azote, quelques acides aminés. Aucun des classiques facteurs de croissance, si on les ajoute à ces milieux synthétiques, ne paraît accélérer sensiblement la multiplication. Certains glucides et alcools (glucose et glycérine, par exemple) peuvent, on le sait, servir d'aliment énergétique au bacille tuberculeux ; ils augmentent la consommation d'oxygène et le rendement, sans agir de façon appréciable sur le taux de croissance. Il importe de souligner ici que l'acide citrique, contrairement à une opinion assez répandue, ne semble être utilisé ni pour la respiration des bacilles de Koch, ni pour leurs synthèses protoplasmiques. L'action de cet acide sur la croissance, observée par certains auteurs, est probablement due aux complexes solubles qu'il forme avec l'ion magnésium, ce dernier étant requis en quantité très importante pour la croissance du bacille de Koch.

Certains acides gras à longue chaîne (acides palmitique, oléique, linoléique, linolénique, lignocérique, etc.) exercent sur le bacille tuberculeux une action remarquable. Ils augmentent très fortement la consommation d'oxygène et peuvent accélérer de façon appréciable la vitesse de multiplication. Pourtant, ces mêmes acides peuvent aussi avoir une action bactéricide intense, même aux pH physiologiques. Cette action toxique ne se manifeste pas quand les acides gras sont utilisés sous forme d'esters, à moins que ces derniers ne soient hydrolysés par les lipases que produisent les bacilles, ou par celles qui existent dans les milieux organiques naturels. En outre, deux types de substance

ont la propriété de neutraliser cette action toxique si on les ajoute au milieu en proportion convenable : la sphingomyéline et l'albumine du sérum.

Une molécule d'albumine s'unit à 5 à 7 molécules d'acide gras pour former un complexe dans lequel l'acide gras reste disponible pour le bacille comme substrat métabolique, tout en perdant sa toxicité (non seulement pour le bacille de Koch, mais pour d'autres bactéries, pour les protozoaires, pour les globules rouges, les leucocytes, etc.).

L'albumine possède cette propriété remarquable de neutraliser la toxicité non seulement des acides gras, mais aussi d'une grande variété d'autres substances (substances tensio-dépressives, phénols, quinones, métaux lourds, etc.) qui contaminent souvent la verrerie de laboratoire, ainsi que les produits naturels et peuvent ainsi, dans certains milieux de culture, exercer un effet bactériostatique et bactéricide sur le bacille tuberculeux. Or, fait remarquable et très important du point de vue pratique, l'albumine du sérum possède ce pouvoir protecteur à un beaucoup plus haut degré que toute autre substance testée jusqu'ici. On peut utiliser cette propriété, comme nous le verrons, pour assurer le développement d'ensemencements minimes de bacilles de Koch au cours des opérations bactériologiques.

On soupçonne, depuis longtemps, que c'est à la nature hydrophobe de leur surface que les bacilles tuberculeux doivent leur tendance à former des amas épais de cellules adhérentes les unes aux autres. C'est ce qu'on a exprimé en parlant d'une « capsule cireuse » qui envelopperait les bacilles, expression imagée bien que probablement inexacte. Nous avons cherché à « mouiller » cette surface hydrophobe en ajoutant aux milieux de culture certaines substances tensio-dépressives détergents). En dépit de nombreux essais, nous n'avons pu trouver, jusqu'ici, que trois catégories de détergents utilisables :

1° Polyéthers arylalkyliques du phénol ;

2° Esters polyoxyéthyléniques d'acides gras à longues chaînes :

3° Dérivés polyoxyéthylénés d'esters sorbitaniques d'acides gras à longues chaînes.

Nous avons surtout utilisé jusqu'ici un produit appartenant à cette troisième catégorie, produit connu sous le nom commercial de Tween 80 (1). Le Tween 80, à la concentration de 0,02 p. 100 dans les milieux liquides à l'albumine, assure une culture dispersée des bacilles de Koch, sans modifier par ailleurs leurs caractères morphologiques et biologiques. Il est important

(1) Des observations récentes, cependant, nous portent à penser que les esters d'acide oléique et de polymères d'oxyde d'éthylène présentent peut-être certains avantages sur le Tween.

de savoir que les lipases peuvent hydrolyser le Tween et libérer ainsi les acides gras que sa molécule contient sous forme d'esters. C'est pourquoi le Tween perd plus ou moins rapidement ses propriétés mouillantes dans les milieux contenant du sérum ou des tissus animaux non chauffés. Certains bacilles tuberculeux peuvent, eux aussi, attaquer le Tween par hydrolyse et en libérer l'acide gras ; or, cet acide gras, qui est utilisé dans une certaine mesure par les bacilles, peut aussi devenir toxique si sa concentration est trop élevée. En général, la présence dans le milieu d'une certaine quantité d'albumine suffit à neutraliser cette action toxique.

L'application de ces différents principes permet de manipuler et de compter les bacilles de Koch par les techniques usuelles de la bactériologie. Avant d'illustrer cette affirmation par quelques exemples, il nous paraît utile de considérer en détail certains milieux de culture et certaines méthodes en usage actuellement dans notre laboratoire.

Milieu gélosé à l'acide oléique-albumine.

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	1 g.
PO_4HNa_2 , 12 H_2O	6,3 g.
Asparagine.	2 g.

Ajouter :

Eau distillée.	900 cm^3
Hydrolysât enzymatique de caséine	0,5 g. (10 cm^3 de solution à 5 p. 100).
Citrate ferrique d'ammonium.	0,05 g. [1 cm^3 de solution à 5 p. 100] (2).
SO_4Mg , 7 H_2O	0,01 g. (1 cm^3 de solution à 1 p. 100).
CaCl_2	0,0005 g. (1 cm^3 de solution à 0,05 p. 100).
SO_4Zn	0,0001 g. (1 cm^3 de solution à 0,01 p. 100).
SO_4Cu	0,0001 g. (1 cm^3 de solution à 0,01 p. 100).
pH 6,5 à 6,8	
Agar.	15 g.

Autoclaver. Refroidir jusqu'à 60° C environ.

Ajouter :

Complexe d'acide oléique-albumine	100 cm^3 de la solution à 5 p. 100.
Glucose	10 cm^3 de la solution à 50 p. 100 dans de l'eau distillée.

Distribuer dans des boîtes de Petri (25 cm^3 environ) ou dans de petites boîtes (15 cm^3).

2) Il est préférable d'utiliser une solution fraîchement préparée de citrate ferrique d'ammonium, pour éviter la formation de cristaux

PRÉPARATION DU COMPLEXE D'ACIDE OLÉIQUE-ALBUMINE. — Dissoudre dans un petit flacon 0,12 cm³ d'acide oléique dans 10 cm³ de NaOH N/20, en secouant avec un mouvement rotatoire.

Ajouter 5 cm³ de cette solution à 95 cm³ d'une solution à 5 p. 100 de fraction V d'albumine bovine (solution dans de l'eau physiologique à 0,85 p. 100, neutralisée).

Stériliser par filtration.

Nous utilisons ce milieu avec succès depuis près de trois ans. Mais nous avons constamment cherché à l'améliorer et nous y avons apporté récemment des modifications dont certaines ont été assez étudiées pour être discutées ici.

SOLUTION MINÉRALE. — On pourrait se passer d'ajouter au milieu la plupart des éléments inorganiques indiqués dans la formule précédente si l'on remplaçait l'eau distillée par l'eau du robinet ; malheureusement, certaines eaux de robinet exercent sur la croissance des bacilles un effet inhibiteur.

Les ions fer et surtout magnésium sont d'une importance toute spéciale quand on désire obtenir de gros rendements de bacilles, car leur insuffisance est, en général, un des premiers facteurs qui limitent la croissance microbienne. Malheureusement, quand on augmente leur concentration, on observe souvent au sein du milieu la formation de cristaux qui gênent l'observation. On pourrait probablement obvier à cet inconvénient en ajoutant une quantité convenable d'ion citrique. Rappelons, en passant, que le bacille de Koch ne métabolise pas l'acide citrique et qu'on peut donc se servir de celui-ci comme tampon en plus du phosphate ou à sa place.

ACIDES AMINÉS. — Sans doute, dans certaines conditions, le bacille tuberculeux est-il capable d'utiliser l'ammoniaque pour ses synthèses organiques ; il ne nous a pourtant pas été possible de faire pousser de faibles ensemencements en l'absence d'acides aminés. Par contre, en présence d'asparagine et d'hydrolysât enzymatique de caséine, toutes les souches que nous avons étudiées (qui s'élèvent maintenant à une centaine) poussent facilement et chaque bacille ou groupe de bacille donne naissance à une colonie.

En outre, nous pensons avoir établi récemment que l'on pouvait, plus simplement, remplacer ces corps azotés par le seul acide glutamique (à la concentration de 0,3 p. 100). Nous avons étudié jusqu'à présent la croissance dans un tel milieu de 15 souches de laboratoire — humaines et bovines — et de quelques autres souches isolées de crachats de malades : elle s'est

montrée appréciablement plus rapide que dans les milieux à l'asparagine (3).

Il serait prématuré, cependant, de généraliser à partir de ces résultats : nous avons récemment découvert que certains acides aminés (en particulier, la sérine et l'alanine) exercent une action nocive sur les bacilles virulents ; de tels faits nous incitent à la prudence.

Certains chercheurs ont pensé qu'il y aurait avantage à enrichir le milieu (par l'addition de peptone et de protéines, par exemple). On peut parfois obtenir ainsi une croissance plus abondante ; mais ce qu'on gagne en richesse, on le perd en sélectivité. C'est à dessein que nous nous sommes efforcés de supprimer tout ce qui n'était pas essentiel à la croissance du bacille tuberculeux. Si, à ce milieu relativement pauvre, on ajoute de la pénicilline, on évite la croissance de la plupart des germes associés. Ainsi Schwartzmann [13] a montré que le colibacille devenait sensible à des doses modérées de pénicilline lorsqu'on l'ensemencait dans des milieux liquides déficients en certains acides aminés. Nous ajoutons couramment 50 unités de pénicilline par centimètre cube, au dernier moment, avec l'albumine et le glucose, pour l'examen bactériologique de produits pathologiques souillés.

SUBSTANCES HYDRO-CARBONÉES. — Les substances hydro-carbonées ne sont pas essentielles à la croissance des bacilles dans ces milieux ; mais certaines d'entre elles — telles que les sucres et la glycérine — en augmentent beaucoup l'abondance et quelque peu la rapidité. Contrairement aux notions traditionnelles, le glucose, plutôt que la glycérine, nous paraît être l'élément de choix. Si ce fait a été méconnu, c'est peut-être parce que le glucose donne naissance à des produits toxiques pour les bacilles si on le chauffe en milieu légèrement alcalin ou même neutre. On peut facilement éviter cet inconvénient en stérilisant le sucre, soit par filtration, soit même à l'autoclave sous forme d'une solution concentrée (50 p. 100 par exemple), légèrement acidifiée par l'acide citrique (1/100 de la solution moléculaire). On ajoute cette solution stérile à froid au milieu de base, de façon à obtenir une concentration finale de 0,2 p. 100 (ou 0,5 p. 100) de glucose.

ALBUMINE DU SÉRUM. — On pourrait penser que le sérum total peut être utilisé comme source d'albumine. Ce n'est qu'en partie exact et, en fait, l'utilisation en est peu pratique. Les différents

(3) Des observations récentes semblent indiquer que le milieu à l'acide glutamique favorise non seulement la croissance des bacilles tuberculeux, mais aussi celle d'un certain nombre de microbes banaux. Il serait un peu moins sélectif.

échantillons de sérum d'une même espèce animale varient beaucoup, et il n'est pas rare d'en rencontrer qui inhibent la croissance du bacille de Koch. De plus, les milieux au Tween additionnés de sérum total ne donnent pas aussi régulièrement que les milieux contenant la fraction V des cultures dispersées. Ceci semble dû à l'action des lipases et de certaines globulines du sérum.

Nous avons donc utilisé presque exclusivement jusqu'ici la fraction V du sérum, séparée par précipitation par l'alcool (méthode de Cohn). Malheureusement ce produit est coûteux et difficile à se procurer en dehors des Etats-Unis.

Pour toutes ces raisons, nous avons cherché à mettre au point une méthode plus simple pour la séparation d'une fraction du sérum, moins pure sans doute, mais qui garderait cependant les propriétés favorables de la fraction V. Cette méthode repose sur le fait qu'en milieu acide l'albumine peut être chauffée à haute température sans que ses propriétés soient altérées, alors que, dans ces conditions, les globulines sont dénaturées. En pratique, le sérum est amené à pH 2-2,5 par addition d'acide chlorhydrique N et chauffé à 65° C pendant vingt minutes. Après refroidissement, on neutralise jusqu'à pH 6,5 avec de la soude décimale. Il se forme un précipité abondant de globulines dénaturées qu'on sépare par filtration. Le filtrat contient une grande partie de l'albumine du sérum sous sa forme native ; on peut en déterminer la concentration par précipitation à l'acide trichloracétique. Le liquide est stérilisé par filtration et utilisé au lieu de la fraction V.

Nous avons préparé de cette manière et utilisé avec succès du sérum de bœuf, de lapin et de cheval, ainsi que du sérum humain. Avec certains échantillons, en particulier de sérum humain, on obtient après neutralisation un précipité colloïdal qui défie la filtration ou la centrifugation. Il suffit alors d'ajouter au sérum chauffé et neutralisé un peu d'éther (ou de chloroforme) et d'agiter légèrement pour obtenir la coagulation du précipité et en faciliter ainsi la séparation.

Lorsqu'on utilise cette préparation d'albumine, il faut omettre de la formule du milieu l'acide gras qui devient alors non seulement inutile, mais même nuisible. Ceci paraît dû au fait que cette fraction d'albumine du sérum est déjà saturée, alors que, dans la fraction V, une partie importante des acides gras se trouve éliminée au cours de la purification par l'alcool.

On obtient ainsi un milieu relativement sélectif où les bacilles tuberculeux poussent régulièrement (on peut démontrer statistiquement que chaque bacille vivant, ou groupe de bacilles, donne naissance à une colonie) et rapidement. C'est un milieu parfaitement transparent, et c'est là un de ses principaux avantages.

Grâce à cette propriété, on peut, en effet, devancer l'échéance de l'apparition des colonies visibles à l'œil nu : avec un peu d'habitude, on peut déceler au faible grossissement du microscope des colonies au sixième ou huitième jour (quelquefois dès le troisième jour), encore très petites, mais très caractéristiques par la forme finement serpentine qu'elles assument (fig. 1).



FIG. 1. — Culture de H37 RV sur milieu gélosé à l'albumine-acide oléique (milieu basal à l'asparagine-hydrolysate de caséine).

Cette figure montre à un fort grossissement la structure typique finement serpentine des colonies de bacilles tuberculeux virulents; on peut, grâce à cette structure, identifier des colonies encore très petites (en haut et à gauche, gross. $\times 230$.)

On peut faire cet examen sans ouvrir la boîte de Petri, à travers le verre, en évitant ainsi tout risque de contamination du milieu. La transparence du milieu se prête à l'étude morphologique des colonies qui, pour une dilution convenable, apparaissent bien séparées. Nous avons décrit ailleurs [12] la structure serpentine des colonies de bacilles virulents humains ou bovins et les différences morphologiques qui existent entre celles-ci et celles des souches moins virulentes.

Cultures en milieu liquide.

En omettant la gélose de la formule précédente, on obtient un milieu liquide dans lequel les bacilles de Koch poussent en granules compacts qui se déposent au fond du tube. Si l'on remplace l'acide oléique par du Tween [que l'on peut ajouter au milieu de base à la concentration de 0,02 p. 100 avant de le stériliser à l'autoclave] (4), la culture se présente sous une forme beaucoup plus homogène, se composant après quelques jours d'un mélange de bacilles isolés et d'amas microscopiques, qui se dépose, lui aussi, au fond du tube, mais se remet facilement en suspension.

Quand on emploie, au lieu de la fraction V, l'albumine extraite du sérum chauffé, il est plus difficile d'obtenir la multiplication de faibles ensemencements en présence de Tween ; il suffit cependant d'une goutte de culture ensemencée dans 5 cm³ de milieu pour donner une culture abondante en une semaine.

Il est important què, dans les tubes ou dans les flacons, la couche de liquide ne dépasse pas 2 cm. d'épaisseur, ceci sans doute parce qu'autrement la diffusion de l'oxygène est insuffisante. Pour cette raison, il nous a été impossible d'utiliser les cultures en profondeur, pour augmenter le rendement en bacilles. Nous n'avons pas réussi non plus à augmenter de façon appréciable la multiplication bacillaire en agitant ou en aérant les milieux liquides.

Dans les expériences qui demandent de forts rendements bacillaires, nous obtenons une multiplication rapide et abondante en surface par de légères modifications dans la composition du milieu : suppression du Tween, diminution de l'albumine et augmentation du fer, du magnésium et du glucose [8].

PRÉPARATION ET DILUTION DES SUSPENSIONS BACILLAIRES.

Une première difficulté dans la préparation des suspensions bacillaires est d'assurer la viabilité de tout l'ensemencement. Comme nous l'avons signalé, les bacilles tuberculeux, surtout en suspensions diluées, sont très sensibles à l'action nocive de diffé-

(4) Il est important d'employer du Tween frais, non hydrolysé, mis récemment en solution. Il est important aussi, quand on emploie du Tween, de se mettre à l'abri de l'activité lipasique qu'a parfois la fraction V et qui peut hydrolyser le Tween. On y parviendra par le procédé suivant : chauffage à 56° C de la solution d'albumine après l'avoir additionnée de 1 à 2 p. 100 de NaCl ou rigoureusement neutralisée afin d'éviter la précipitation de l'albumine. Il est préférable de pratiquer cette opération après filtration pour ne pas encrasser les bougies. L'hydrolyse du Tween 80 libère des acides gras toxiques pour les bacilles tuberculeux.

rentes substances qui contaminent souvent les instruments et les produits que l'on utilise au cours des manipulations bactériologiques. Mais on peut neutraliser ces effets toxiques en ajoutant un peu d'albumine du sérum (0,1 p. 100) aux solutions dans lesquelles on prépare et dilue les suspensions bacillaires.

Un deuxième problème est d'obtenir des suspensions homogènes. Cette condition se trouve réalisée dans les cultures en milieu au Tween, tout au moins dans une mesure suffisante pour la plupart des opérations bactériologiques. S'il est nécessaire, on peut augmenter encore l'homogénéité des suspensions, en les agitant dans des flacons coniques pendant quinze minutes, puis en les filtrant sur une double épaisseur de papier filtre. On obtient ainsi une suspension qui ne contient plus que des bacilles isolés ou en très petits groupes ; si on ensemence celle-ci sur milieu gélosé après l'avoir diluée dans une solution d'albumine à 0,1 p. 100, on obtient des numérations très précises.

Pour obtenir des suspensions homogènes à partir des cultures en voile et en amas sur les milieux classiques ou à partir des tissus animaux bacillifères, on peut les broyer en présence d'oxyde d'aluminium [Al_2O_3] (5), dans une solution d'albumine. Il est à conseiller d'utiliser alors une solution d'albumine à 2 p. 100 pour éviter l'effet toxique des produits d'autolyse des tissus et, pour les dilutions ultérieures, la solution à 0,1 p. 100.

Les propriétés respectives de ces différents milieux en font des instruments de travail spécialisés, qu'on ne saurait utiliser indifféremment à toutes fins. Suivant qu'on cherche à obtenir la croissance rapide de petits ensemencements dans un but diagnostique, à apprécier quantitativement l'action d'un antibiotique, à conserver des cultures stables de laboratoire ou à étudier leurs différents aspects, on aura avantage à utiliser un milieu gélosé ou liquide, avec ou sans Tween. Ce sont ces différentes applications que nous nous proposons d'indiquer ici.

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE.

Dans les milieux destinés au diagnostic bactériologique, l'emploi du Tween 80 n'est pas indiqué. Son avantage principal réside dans l'obtention de cultures homogènes qu'on n'a, dans ce cas, aucune raison de rechercher. En outre, nous avons montré ailleurs [9] qu'en présence de Tween (comme d'autres substances tensio-dépressives) les bacilles de Koch deviennent sensibles à l'action inhibitrice de la pénicilline, à laquelle ils sont complètement résistants dans les milieux à l'albumine sans Tween. Il y a donc grand avantage à utiliser, pour l'examen bactériologique

(5) « Alundum, 90 mesh » de Norton Co, Worcester, Mass.

de produits souillés, un milieu sans Tween, additionné de pénicilline.

Il serait prématuré, à l'heure actuelle, de décrire une technique précise d'utilisation des milieux liquides pour le diagnostic bactériologique. Pour le liquide céphalo-rachidien, il semble qu'il suffise d'ensemencer directement la totalité de l'échantillon disponible dans une quantité égale de milieu (au besoin dans un flacon d'Erlenmeyer ou dans plusieurs tubes). Il y a tout intérêt à ne pas attendre une croissance appréciable à l'œil nu, mais à prélever aseptiquement tous les quelques jours un échantillon de la culture et à l'examiner sur lame. On peut découvrir ainsi, après quelques jours, des amas de bacilles assumant la forme serpentine.

Il semble que, lorsqu'on a ensemencé un liquide pauvre en bacilles, on puisse augmenter les chances de découvrir ces amas dans un échantillon de culture en les concentrant par la technique suivante, que nous avons récemment mise au point. Le principe en est de précipiter l'albumine du milieu, ce qui entraîne les bacilles dans le précipité qu'on remet ensuite en solution dans une faible quantité de liquide.

Ajouter à l'échantillon de culture assez de solution saturée de NaCl pour donner une concentration finale de 8 à 10 p. 100 (soit environ 2 cm³ pour 5 cm³). Acidifier avec une solution normale d'HCl jusqu'au point de précipitation maxima de l'albumine (pH 5,4), environ III gouttes pour 5 cm³. Centrifuger. Remettre le culot en suspension dans une aussi petite quantité que possible d'eau distillée ou de solution de NaOH.

On peut employer la même méthode pour examiner l'échantillon de liquide céphalo-rachidien lui-même, soit en précipitant l'albumine du liquide si la concentration en est suffisante, soit en ajoutant, au préalable, à l'échantillon, un peu de solution d'albumine. Ce procédé facilite la découverte des bacilles par l'examen microscopique direct. On pourrait se demander si une telle méthode ne serait pas utilisable pour séparer les bacilles de la streptomycine que contient le liquide rachidien chez un malade traité et éviter ainsi l'action inhibitrice de celle-ci sur la culture. Mais il n'est pas encore démontré que ce traitement du liquide avant son ensemencement n'affecte pas la vitalité des bacilles.

Pour l'examen des crachats, nous avons utilisé jusqu'ici les méthodes classiques de digestion par la soude ou l'acide sulfurique suivie de neutralisation et de centrifugation. On peut ensuite introduire le culot dans un milieu liquide additionné de pénicilline. Ce procédé n'est, en général, pas suffisant, quand on part de produits aussi souillés, pour éviter le développement simultané d'autres germes : c'est parmi ces derniers qu'on reconnaîtra le bacille tuberculeux par l'examen microscopique. En

général, on préfère étaler l'échantillon sur une ou plusieurs plaques de gélose (albumine-acide oléique) qu'on scelle par un moyen convenable pour retarder le dessèchement au cours de l'incubation. Avec un peu d'habitude, il est relativement facile de reconnaître, parmi les autres colonies microbiennes, celles du bacille de Koch, encore qu'elles assument parfois dans ce cas une morphologie un peu différente de celle que nous avons décrite (fig. 2). Rappelons, d'autre part, que la morphologie paraît être différente sur le milieu à l'acide glutamique.

ÉTUDE DE LA RÉSISTANCE DES BACILLES TUBERCULEUX
A LA STREPTOMYCINE ET A L'ACIDE PARA-AMINO-SALICYLIQUE (PAS).

Il est facile d'incorporer aux milieux à l'albumine, liquides ou solides, de la streptomycine, du PAS ou d'autres agents chimiothérapeutiques, en concentrations graduées, et de déterminer ainsi la résistance des diverses souches à ces agents. Deux méthodes différentes peuvent être utilisées pour étudier la résistance des bacilles présents dans les produits pathologiques.

On peut isoler les bacilles, puis les transplanter dans de nouveaux milieux contenant des concentrations croissantes de la substance à l'étude pour déterminer la concentration inhibitrice minima. Dans ce cas, les milieux au Tween sont indiqués, car il est important d'obtenir des cultures homogènes, d'abord pour assurer la régularité d'ensemencement dans les différents tubes contenant l'agent thérapeutique, ensuite pour comparer plus facilement la croissance en présence de concentrations variées de cet agent. Mais la question se pose de savoir si la présence de Tween, agent « mouillant », ne modifie pas la susceptibilité des bacilles aux substances chimiothérapeutiques que l'on étudie. En ce qui concerne la streptomycine et le PAS, la susceptibilité des bacilles tuberculeux augmente légèrement en présence de Tween (à peu près du double), mais, comme cet effet est le même pour les souches hautement sensibles et pour celles qui ont acquis une certaine résistance, il ne gêne nullement la détection des changements éventuels de résistance au cours de traitement.

Cette méthode a l'avantage de permettre une mesure exacte et facile de l'ensemencement et de donner, par conséquent, des résultats qui paraissent précis. Mais elle comporte deux causes d'erreurs possibles qui peuvent être de grande importance pratique. D'une part, il n'est pas démontré que la résistance de la population microbienne en culture pure soit le reflet exact de la résistance de la population microbienne moyenne du produit pathologique : il pourrait fort bien se faire, au cours de cultures successives, une sélection qui augmente ou qui diminue la résistance. D'autre part, cette méthode ne donne aucune idée de la proportion de la population microbienne qui, dans les tissus, est



FIG. 2. — Culture directe de crachats sur milieu gélosé à l'albumine-acide oléique (milieu de base à l'asparagine-hydrolysat de caséine).

Les colonies de droite sont engluées dans du mucus. Chez certaines, on ne peut nullement reconnaître la structure serpentine. Celle-ci commence à réapparaître chez les deux colonies supérieures qui émergent du mucus et chez celle (coupée) qui se trouve en bas et à droite. La grande colonie qui occupe la partie gauche de la figure est typique.

résistante aux différentes concentrations d'antibiotiques, et cette donnée peut être fort importante du point de vue clinique.

Il est donc certainement préférable de faire l'étude de la résistance directement sur le produit pathologique, toutes les fois que c'est pratiquement possible, c'est-à-dire toutes les fois qu'il est suffisamment riche en bacilles tuberculeux vivants. En pareil cas, il est facile d'ensemencer des quantités connues de crachats sur la surface de milieux gélosés, les uns ne contenant pas de streptomycine, les autres en contenant 1, 10, 100, 1.000 γ par centimètre cube. Un examen microscopique préalable ayant donné une idée approximative de la richesse en bacilles de l'échan-

Distribution de la résistance à la streptomycine dans la population bacillaire et son évolution. Etudes de l'expectoration de deux malades atteints de tuberculose pulmonaire et traités par la streptomycine.

SPÉCIMEN	NOMBRE TOTAL de B. K.	NOMBRE DE BACILLES RÉSISTANTS		
		à 10 u.	à 100 u.	à 1.000 u.
M. 26 février 1949 (subculture des crachats).	≤ 300.000 (?)	≤ 30.000 (?) (3)	30.000	10.000 à 15 000
M. 14 avril 1949 (crachats).	200.000	100.000	60.000	40.000 environ [très petites colonies] (1)
M. 8 juin 1949 (crachats). M. 8 juin 1949 (subculture) (2).	13.600 3.100	8.800 2.550	6.400 1.400	4 800 1 600
S. 2 mars 1949 (subculture).	500.000	220.000		≤ 3.000 (?) (3)
S. 8 juin 1949 (crachats).	56.000	43.000	40.000 ?? = très petites colonies (1)	

N. B. — Les examens successifs chez un même malade montrent une augmentation progressive de la proportion de la population microbienne qui présente une résistance donnée. (1) Les cultures n'ont, parfois, pas pu être comptées parce que, en présence de streptomycine, elles demeuraient très petites. (2) Les titrages faits sur un spécimen donné et sur une culture en milieu liquide de ce même spécimen paraissent indiquer que la proportion des germes résistants peut se modifier au cours de la culture en milieu liquide. (3) Dans quelques cas, les cultures avaient été trop diluées pour permettre le comptage des colonies.

tillon, on peut faire des dilutions convenables pour obtenir un nombre de colonies susceptible d'être compté (6). Le nombre de colonies de bacilles tuberculeux poussant aux différentes concen-

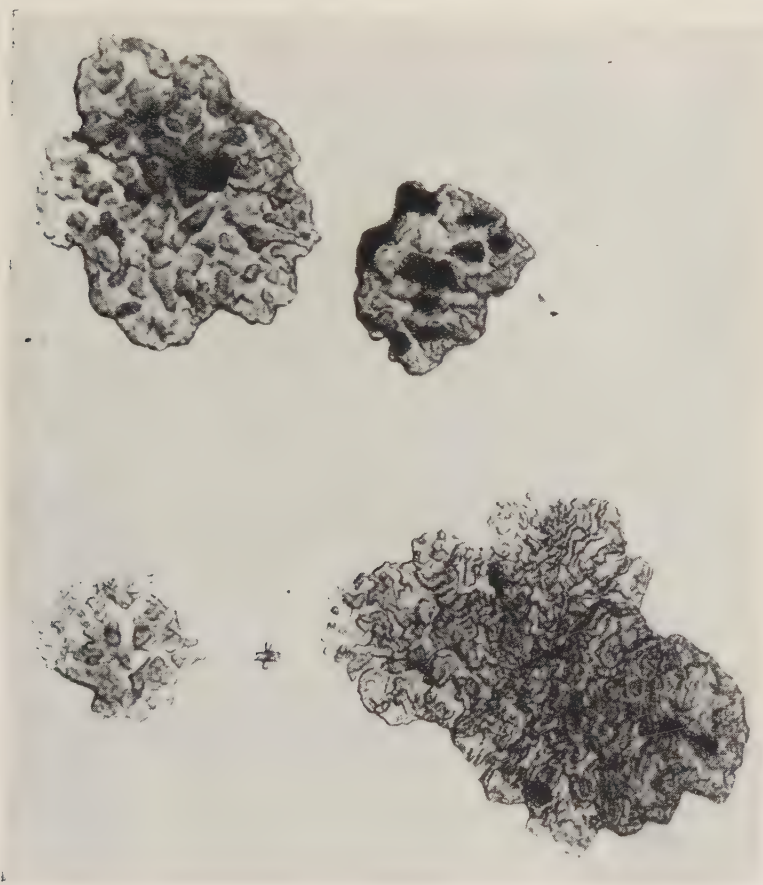


FIG. 3. — Colonies de bacilles ayant développé une résistance élevée à la streptomycine (isolées des crachats d'un malade traité).

A. Culture sur milieu gélosé à l'albumine-acide oléique (milieu de base à l'asparagine-hydrolysate de caséine) avec 50 unités de pénicilline par cm^3 , mais pas de streptomycine. Grandes colonies serpentines. Entre les deux colonies inférieures, on reconnaît un petit cristal de citrate ferrique. (Gross. $\times 27$.)

(6) Les dilutions de crachats peuvent se faire assez facilement en ajoutant au culot de centrifugation de l'échantillon concentré une quantité de soude juste suffisante pour le remettre en solution et en faisant immédiatement les dilutions successives dans une solution d'albumine à 0,5 p. 100 qui joue le rôle de tampon.

trations de streptomycine peut être compté avec précision, ou, plus rapidement, estimé et rapporté à une échelle étalon ; en tout cas, il donne une idée directe de la distribution de la résistance dans l'échantillon original. Cette méthode permet aussi d'estimer

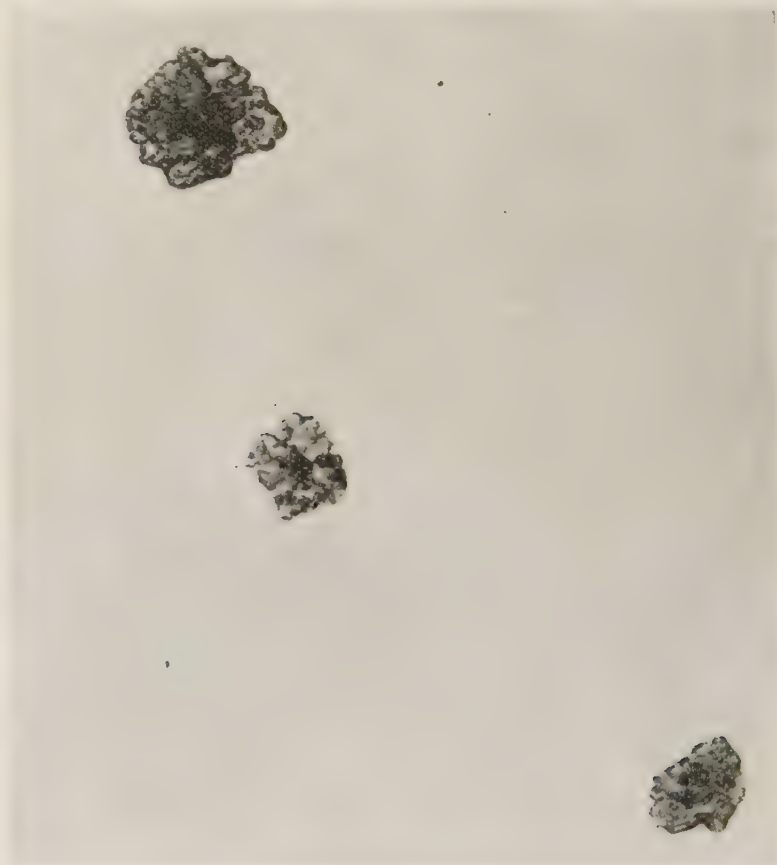


FIG. 3. — Colonies de bacilles ayant développé une résistance élevée à la streptomycine (isolées des crachats d'un malade traité).

B. Culture du même âge, sur milieu identique, mais additionné de 4.000 unités de streptomycine par cm³. Le grossissement est le même. Le nombre des colonies n'est pas appréciablement différent, mais la taille moyenne des colonies est beaucoup plus petite que sur le milieu sans streptomycine. (Gross. $\times 27$.)

la taille des colonies et c'est peut-être un point important, car nous avons observé une croissance beaucoup moins rapide des colonies qui poussent en présence de fortes concentrations de streptomycine (fig. 3, A et B).

ENTRETIEN ET ÉTUDE DES CULTURES PURES DE BACILLES DE KOCH.

Depuis plus de trois ans, notre collection de souches de bacilles de Koch est maintenue en milieux liquides au Tween (0,02 p. 100). Des repiquages hebdomadaires (1 goutte de culture pour 5 cm³

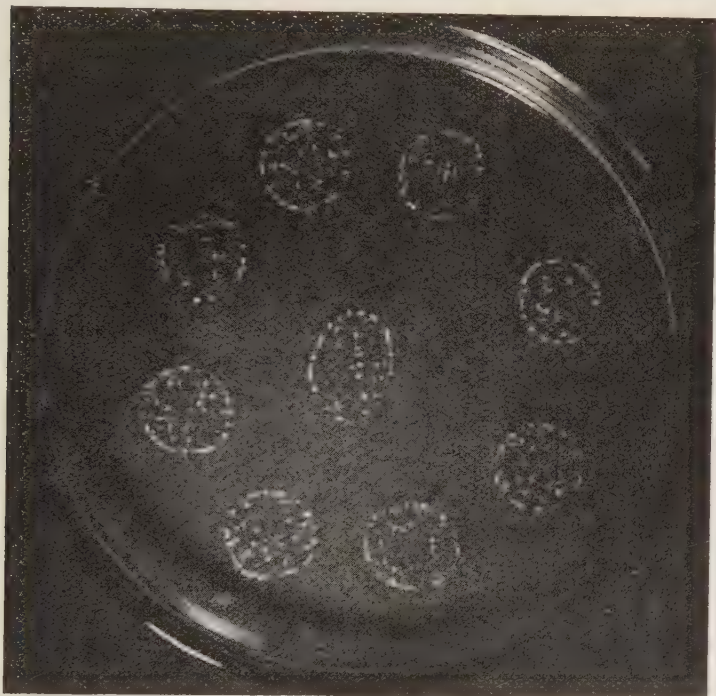


FIG. 4. — Culture de bacilles tuberculeux sur milieu gélosé destinée à la numération des colonies

L'ensemencement a été fait sous forme de gouttes de 0,02 cm³.

Pour la dilution utilisée (10^{-3}), le nombre de colonies se prête à la numération. Avec une bonne technique, on atteint à une homogénéité très satisfaisante des dilutions.

de milieu) nous assurent des cultures jeunes, homogènes et de propriétés constantes pour les expériences *in vitro* et *in vivo*.

En étalant des dilutions convenables avec une baguette de verre stérile sur la surface du milieu gélosé, ou en les déposant sous forme de gouttes de 0,02 cm³, on peut obtenir des colonies bien séparées qui se prêtent aux numérations comme à l'observation morphologique (fig. 4).

Les numérations montrent que nos cultures en milieu liquide

au Tween, après sept ou quinze jours d'étuve à 37° C, contiennent de 10⁸ à 10⁹ unités bacillaires vivantes par centimètre cube.

L'étude morphologique des colonies montre une différence d'organisation entre les colonies de bacilles virulents et celles de bacilles avirulents — que nous avons décrite ailleurs. Les souches virulentes apparaissent avec une structure serpentine due à la tendance qu'ont les bacilles à adhérer l'un à l'autre, côte à côte et bout à bout. Au contraire, cette organisation ne se reconnaît pas dans les formes complètement avirulentes. Les souches atténuées, comme le BCG, ont une morphologie intermédiaire. Cette organisation si caractéristique se reconnaît aisément dans toutes les souches humaines et bovines que nous avons étudiées. Il n'est pas sans intérêt d'observer qu'on trouve la morphologie serpentine des cultures virulentes chez les souches récemment isolées en Australie, qui causent de graves ulcères du derme et qui ne se développent qu'au-dessous de 33° C.

Notons, en passant, qu'il n'y a vraiment aucune justification théorique ou pratique à dire que les colonies sur ces milieux ne sont pas « typiques ». On ne saurait prendre comme critère du « type » l'apparence des colonies de bacilles de Koch sur du jaune d'œuf coagulé ! A vrai dire, Robert Koch lui-même [10] a souvent signalé l'apparence serpentine des chaînes de bacilles dans les tissus et dans ses cultures, de même que beaucoup d'autres après lui, par exemple Maximow, dans un article publié en 1928, dans les *Annales de l'Institut Pasteur* [11]. Cette organisation serpentine est exactement celle que l'on obtient sur les milieux à l'albumine et à l'acide oléique et elle mérite d'être considérée comme typique au même titre que celle qu'on a pris l'habitude de voir en utilisant des milieux à l'œuf.

Rappelons, ici encore, que ces observations morphologiques ont été faites sur des milieux contenant de l'asparagine et de l'hydrolysât de caséine et qu'il n'est pas certain qu'elles s'appliquent également aux colonies développées sur milieu à l'acide glutamique.

PRÉPARATION DU BCG EN MILIEU AU TWEEN ET A L'ALBUMINE.

Nous avons cultivé trois différentes souches de BCG en milieu liquide contenant 0,2 p. 100 de glucose, 0,02 p. 100 de Tween et du sérum humain chauffé (voir p. 213), en quantité correspondant à 0,5 p. 100 d'albumine. On obtient ainsi, en une semaine, des cultures homogènes et d'une extrême stabilité. Après trois semaines à la température du laboratoire (22° C) et six semaines à la glacière (5° C), ces cultures contenaient encore plus de 10⁸ unités vivantes par centimètre cube. Une inoculation au

cobaye de 10^{-6} cm³ de cette culture suffit à le rendre sensible à la tuberculine. Plusieurs groupes de cobayes qui avaient été inoculés avec 0,1 cm³ de cultures de BCG âgées respectivement de une, trois et six semaines, ont été ensuite infectés avec de fortes doses de bacilles humains virulents. A l'heure actuelle, ils apparaissent normaux, alors que tous les témoins ou bien sont déjà morts, ou bien présentent les signes d'une infection tuberculeuse très sévère dont l'issue sera probablement fatale.

Les résultats complets de ces expériences seront publiés prochainement [6]. Cette technique n'a certes pas encore été étudiée suffisamment, ni dans ses bases théoriques, ni dans ses applications pratiques, mais elle semble devoir présenter certains avantages. Tout d'abord, elle rend inutile le broyage des cultures, et élimine beaucoup des risques de contamination en supprimant les opérations de transvasement. On peut injecter la préparation directement ou après simple dilution, le milieu étant complètement synthétique, sauf en ce qui concerne l'albumine et celle-ci est d'origine humaine. Mais, ce qui est plus important encore, elle permet d'obtenir des préparations stables qualitativement et quantitativement, dans lesquelles on peut déterminer avec précision le nombre de bacilles vivants. Il est certain que la pratique courante de définir les préparations de BCG en milligrammes de bacilles ne donne aucune mesure de la quantité effective qu'on injecte puisque, d'une préparation à l'autre et, pour une même préparation, suivant le temps qui s'est écoulé depuis la mise du vaccin en suspension, le nombre des bacilles vivants varie de façon énorme : il y a souvent 1.000 ou 10.000 fois moins de bacilles vivants dans une préparation que dans une autre. Il nous paraît probable que c'est à cette difficulté technique fondamentale que tiennent beaucoup des irrégularités que l'on observe dans les résultats de la vaccination et c'est dans l'espoir de contribuer à la solution de ce problème que nous proposons la culture homogène de BCG dans le milieu au Tween et à l'albumine humaine.

CONCLUSIONS.

Les milieux semi-synthétiques liquides et gélifiés décrits dans ce mémoire permettent la culture, l'identification et la numération de toutes les souches de bacilles de Koch étudiées jusqu'ici, tant à partir de cultures pures que directement à partir de produits pathologiques bacillifères.

Ces milieux se prêtent donc à l'étude qualitative et quantitative de nombreux problèmes de la tuberculose clinique et expérimentale. L'étude comparative des souches virulentes et avirulentes, le diagnostic bactériologique, la détermination de la résistance des bacilles de Koch aux agents chimiothérapeutiques, la produc-

tion de cultures homogènes et stables de BCG constituent seulement quelques exemples illustrant l'utilité de ces nouveaux milieux. Une expérience de plus de trois ans nous donne la conviction que les méthodes basées sur l'emploi des milieux semi-synthétiques sont suffisamment simples pour donner partout des résultats constants, à condition qu'on en comprenne les principes et que l'on évite de grossières erreurs techniques.

En outre, et surtout, alors que l'empirisme total des milieux à l'œuf n'offre aucun espoir de progrès, la simplicité de ces milieux semi-synthétiques permet d'envisager toutes sortes d'améliorations.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DAVIS (B. D.) et DUBOS (R. J.). *J. exp. Med.*, 1947, **86**, 215.
- [2] DUBOS (R. J.). *J. exp. Med.*, 1947, **85**, 9.
- [3] DUBOS (R. J.). *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 73.
- [4] DUBOS (R. J.) et DAVIS (B. D.). *J. exp. Med.*, 1946, **83**, 409.
- [5] DUBOS (R. J.), DAVIS (B. D.) MIDDLEBROOK (G.) et PIERCE (C.). *Am. Rev. Tub.*, 1946, **54**, 204.
- [6] DUBOS (R. J.), FENNER (F.) et PIERCE (C.). *Am. Rev. Tub.* (en préparation).
- [7] DUBOS (R. J.) et MIDDLEBROOK (G.). *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 81.
- [8] DUBOS (R. J.) et MIDDLEBROOK (G.). *Am. Rev. Tub.*, 1947, **56**, 334.
- [9] KIRBY (W. M. M.) et DUBOS (R. J.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1947, **66**, 120.
- [10] KOCH (Robert). *Ouvres complètes*, 1912, **4**, 467-565. George Thieme. Leipzig.
- [11] MAXIMOW (A.). *Ces Annales*, 1928, **42**, 225.
- [12] MIDDLEBROOK (G.), DUBOS (R. J.) et PIERCE (C.). *J. exp. Med.*, 1947, **86**, 175.
- [13] SCHWARTZMANN (G.). *J. exp. Med.*, 1946, **83**, 65.

LE DISTILLAT D'HUILE DE FOIE DE MORUE

PROPRIÉTÉS ANTIBIOTIQUES ET PREMIÈRES APPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES

Par J. SOLOMIDÈS.

(Institut Pasteur, Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose.)

En 1946, nos travaux sur l'oléolyse des cultures tuberculeuses sur pomme de terre [1 a] nous ont amené à étudier les propriétés antibactériennes de l'huile de foie de morue et à chercher les moyens d'en augmenter la puissance. A cet effet, nous avons eu recours à deux procédés distincts. Le premier consiste à ioder l'huile de foie de morue (H. F. M.) suivant la technique que nous indiquerons plus loin. Ainsi que nous l'avons montré récemment [1 b], on obtient ainsi une huile beaucoup plus bactéricide que l'H. F. M. non iodée. Le deuxième procédé consiste à soumettre l'H. F. M. à une distillation à la pression atmosphérique et à recueillir le produit de cette distillation ou distillat dont nous nous proposons d'étudier, dans ce mémoire, les propriétés antibactériennes et thérapeutiques.

MODE DE PRÉPARATION.

Un ballon en pyrex de 500 cm³, contenant 150 à 200 cm³ d'H. F. M. est vigoureusement chauffé, de façon que les vapeurs d'H. F. M. atteignent rapidement 250°. En pratique, on diminue légèrement le chauffage dès que le thermomètre qui passe à travers le bouchon de liège monte à 250°. Les vapeurs sont amenées par un tube en verre dans un réfrigérant, où elles sont en grande partie condensées. En effet, si le réfrigérant n'est pas assez long, une partie des vapeurs le traverse sans se condenser et se perd partiellement. Pour opérer dans de bonnes conditions, il est nécessaire de procéder à la distillation sous une hotte dotée, si possible, d'un dispositif d'aspiration. On arrête l'opération lorsque la quantité initiale de l'huile à distiller a été réduite de moitié, par exemple lorsqu'on obtient, pour une quantité initiale de 200 cm³ d'H. F. M., 100 cm³ de distillat.

La température à laquelle la distillation a lieu n'a pas une importance considérable, cependant afin d'obtenir un produit à

propriétés physiques et chimiques à peu près constantes, il importe de se conformer aux règles que nous venons d'exposer. Mais, à un autre point de vue, la variabilité de la température de distillation suivant la quantité de chaleur fournie indique clairement qu'on se trouve en présence, non d'une vraie distillation, mais d'un véritable cracking nécessitant, pour se faire, une certaine quantité de chaleur minimum qu'on n'a pas intérêt à dépasser.

Le distillat d'H. F. M. ainsi obtenu contient beaucoup d'acroléine, substance irritante rendant le produit d'un maniement difficile. Au début de nos recherches, nous l'en débarrassions en exposant le distillat à l'air pendant deux ou trois jours. Actuellement, dans ce but, nous le lavons quatre fois de suite avec son volume d'eau tiède.

On peut aussi diminuer l'odeur pénétrante du produit en entraînant par la vapeur d'eau sa fraction la plus volatile, mais cette opération ne nous paraît pas indispensable.

En définitive, sous le nom de distillat d'huile de foie de morue ou de distillat moruïque, nous allons étudier le produit de distillation, ou plutôt du cracking de l'H. F. M. préparé dans les conditions que nous venons d'indiquer.

PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET CHIMIQUES.

Le distillat moruïque est une huile verdâtre qui devient vite brunâtre, d'odeur pénétrante, désagréable, entièrement soluble dans l'éther, le benzène, l'éther de pétrole et l'alcool éthylique. Il est liquide à 21°, mais laisse déposer des cristaux à la température de 17-18°. Sa densité à 20°, déterminée par la balance de Mohr, est : $D_{20^\circ} = 0,896$. Indice de réfraction déterminé au réfractomètre à gouttes : $i_{20^\circ} = 1,4670$.

Son indice d'iode est de 61 à 65 et celui d'acides de 148 à 158. Quant à son indice de saponification, il est pratiquement égal à son indice d'acides, ce qui montre que sa teneur en esters est pratiquement nulle.

La saponification effectuée par le procédé classique de la potasse alcoolique donne 18 à 20 p. 100 d'insaponifiable, le reste étant constitué par des acides gras (1).

PROPRIÉTÉS ANTIBACTÉRIENNES, GERMICIDES ET BACTÉRIOSTATIQUES.

Nous avons mis en évidence les propriétés germicides du distillat moruïque en 1946 [4 c]. Depuis, nous avons constaté que le dis

(1) Nous adressons nos plus vifs remerciements à M. Dolgopoloff, ingénieur-chimiste, pour l'aide très précieuse qu'il nous a apportée dans la détermination des constantes physiques et chimiques du distillat moruïque.

distillat lavé à l'eau tiède et débarrassé de son acroléine et probablement d'autres substances hydrosolubles, reste encore une huile puissamment bactéricide, beaucoup plus que l'H. F. M. qui lui a donné naissance. Ce fait est démontré par les chiffres que nous donnons ci-après et qui expriment en minutes le temps de survie de divers microbes (souches de l'Institut Pasteur) mis en contact, d'une part avec le distillat moruïque et, d'autre part, avec l'H. F. M.

	DISTILLAT MORUÏQUE	H. F. M.
Staphylocoque doré. . . .	120	360
Colibacille	5	360
Bacille typhique	5	
Bacille de Shiga	5	
<i>Bacillus subtilis</i>	Plus de 360	
Bacille tuberculeux. . . .	90	10.080 (7 jours).
<i>Penicillium notatum</i> . . .	200	10.080 (7 jours).
<i>Streptomyces griseus</i> . . .	20	

Le distillat étant un produit acide et agglutinant, dans lequel il est impossible de faire une suspension microbienne homogène, il a été nécessaire, pour déterminer le temps de survie des microbes autres que le bacille tuberculeux ou les champignons, d'avoir recours au procédé suivant :

On introduit dans des tubes une quantité suffisante d'huile pour recouvrir la couche microbienne qu'on y a préalablement étalée. On procède, par la suite, à partir de cette couche microbienne, à des repiquages dans du bouillon ou sur gélose ordinaire. À cet effet, on la gratte avec une spatule et on ensemence, immédiatement après, ce produit de grattage dans le bouillon ou sur la gélose. Les repiquages sont faits, suivant le microbe à étudier, à des délais variables, assez rapprochés cependant pour qu'on puisse déterminer avec une approximation suffisante, de l'ordre de une, deux ou cinq minutes, le temps de survie des microbes étudiés. Les milieux¹ensemencés restent à l'étuve deux ou trois jours.

Quant au bacille tuberculeux ou aux champignons, nous avons eu recours aux suspensions grossières de ces microbes dans le distillat et aux repiquages à des délais variables en milieu de culture approprié (milieu de Löwenstein ou milieu de Sabouraud). Nous laissons les milieux de Löwenstein un mois à l'étuve et les géloses Sabouraud quinze jours à la température du laboratoire. Un microbe doit être considéré comme étant mort ou étant devenu inapte aux repiquages si tous les ensemencements qui suivent le dernier ensemencement positif restent négatifs.

Les propriétés bactériostatiques du distillat moruïque ont également retenu notre attention. Trois microbes se sont montrés particulièrement sensibles vis-à-vis de celui-ci : le pneumocoque, le streptocoque et le bacille tuberculeux. Les titrages des solutions alcooliques à 1/100 de distillat ont été faits en bouillon ordinaire, de préférence glucosé à 2/1.000 pour les deux premiers germes et en bouillon glycérimé ou en milieu de Sauton pour le bacille tuberculeux.

En ce qui concerne le pneumocoque et le streptocoque, nous avons ensemencé 0,1 cm³ d'une culture en bouillon, âgée de vingt-quatre heures, dans des tubes de bouillon contenant des quantités décroissantes de distillat, et les résultats ont été enregistrés après vingt-quatre heures d'étuve. Dans la plupart des cas, les taux bactériostatiques vis-à-vis du pneumocoque et du streptocoque ont été respectivement de 1/9.000.000 et de 1/900.000. Malheureusement, la présence dans le bouillon de faibles quantités de sérum ou de jaune d'œuf détruit entièrement ces taux bactériostatiques considérables, comme cela s'observe, d'ailleurs, pour les acides gras de l'H. F. M. [1 d].

Vis-à-vis du bacille tuberculeux cultivé en surface en bouillon glycérimé, le distillat s'est montré actif à des taux allant de 1/6.000 à 1/10.000 [1 e]. Par la suite, nous avons abandonné ce procédé peu précis et nous avons titré le pouvoir tuberculostatique du distillat en milieu de Sauton additionné de sérum de cheval à 1/30 et ensemencé avec 0,01 mg. de bacille tuberculeux. Après quatorze jours d'étuve, on constate que le B. K. ne se développe pas (en profondeur) à des dilutions allant de 1/30.000 à 1/50.000 [1 f]. Nous avons obtenu ces mêmes résultats en opérant également sur milieu de Dubos. La présence de sérum en plus grande quantité dans le milieu de Sauton (1/15, par exemple) n'affecte pas le pouvoir tuberculostatique du distillat.

PROPRIÉTÉS ANTIBACTÉRIENNES DES FRACTIONS ACIDE ET INSAPONIFIABLE.

Elles ont été étudiées dans les mêmes conditions et par les mêmes techniques que nous venons d'exposer ; nous nous contenterons donc de rapporter les résultats de ces recherches.

Les acides gras du distillat moruïque, débarrassés de l'éther qu'ils peuvent avoir retenu pendant leur préparation, se sont montrés peu bactéricides ; c'est ainsi que pour le staphylocoque, le colibacille et le bacille tuberculeux, leur pouvoir bactéricide ne se manifeste qu'après plusieurs heures de contact avec ces germes. Des constatations analogues ont été faites en ce qui concerne le pouvoir tuberculostatique de ces acides qui agissent à des dilutions moins élevées, de l'ordre de 1/10.000 en milieu de

Sauton additionné de sérum, alors que le taux tuberculostatique du distillat total est, ainsi que nous l'avons dit plus haut, supérieur à 1/30.000. Par contre, vis-à-vis du streptocoque et du pneumocoque, le pouvoir bactériostatique des acides gras du distillat, titré dans les mêmes conditions que celui du distillat total est de 1/900.000 pour le streptocoque et de 1/9.000.000 pour le pneumocoque. Comme on le voit, la fraction acide du distillat semble donc particulièrement active vis-à-vis du streptocoque et du pneumocoque. Cette activité est cependant neutralisée par la présence dans le milieu de faibles quantités de sérum sanguin.

La fraction insaponifiable s'est montrée sans pouvoir bactériostatique pour le streptocoque et le pneumocoque, mais au moins aussi fortement tuberculostatique que le distillat moruïque dont elle dérive (à 1/30.000). Quant à son pouvoir bactéricide, il a été étudié vis-à-vis des quatre germes suivants et a donné les résultats ci-dessous :

	INSAPONIFIABLE	DISTILLAT TOTAL
Staphylocoque	20	120
Colibacille	10	5
Bacille tuberculeux. . . .	30	90
<i>Penicillium notatum</i> . . .	180	200

Comme on le voit, sauf pour le staphylocoque et le bacille tuberculeux, germes pour lesquels le pouvoir bactéricide de l'insaponifiable semble considérablement augmenté, ainsi qu'on pouvait s'y attendre, ce pouvoir reste le même pour le *P. notatum*, tandis qu'il est deux fois inférieur pour le colibacille. Ce résultat semble dû à l'absence des acides gras qui, dans ce cas, pourraient agir synergiquement avec l'insaponifiable dont ils favoriseraient l'action en abaissant le pH du distillat.

En somme, les acides gras semblent être responsables du pouvoir bactériostatique du distillat moruïque vis-à-vis du pneumocoque et du streptocoque. Ils semblent, en outre, favoriser pour certains microbes l'action de l'insaponifiable. C'est à cette dernière fraction que le distillat moruïque doit ses propriétés bactéricides et tuberculostatiques.

INFLUENCE DE L'IODATION.

Nous avons vu que par simple distillation ou, mieux, cracking de l'H.F.M., on obtient une huile qui, même débarrassée de son acroléine, reste encore fortement bactéricide vis-à-vis de la plupart des microbes que nous avons utilisés dans nos recherches.

Cependant, son pouvoir bactéricide vis-à-vis de certains germes courants, tels que le staphylocoque, le *Bacillus subtilis* et certains champignons (*P. notatum*) ne nous a pas paru assez élevé. Nous avons donc cherché à augmenter la puissance bactéricide du distillat par iodation suivant le procédé suivant [4 g] :

Le distillat, entièrement débarrassé de substances hydrosolubles par lavages répétés à l'eau tiède, est vigoureusement agité avec la moitié de son volume de la liqueur de Lugol (soluté fort : 1 g. d'iode, 2 g. de IK pour 20 cm³ d'eau). On porte le tout au bain-marie à 40-50° pendant quinze minutes, puis on le laisse à la température du laboratoire pendant vingt-quatre heures. Après décantation on obtient un produit noir contenant 5 à 6 p. 100 d'iode. Ce produit n'est pas saturé en iode puisque, par certaines autres méthodes beaucoup plus compliquées (méthode de Hübl), on arrive à fixer sur cette huile des quantités beaucoup plus considérables de cet halogène. Bien entendu, il ne donne pas la réaction classique de l'empois d'amidon et on peut affirmer qu'il n'y a pas d'iode libre dans le distillat.

Voici maintenant les résultats obtenus en opérant suivant la technique précédemment indiquée :

	DISTILLAT IODÉ	DISTILLAT NON IODÉ (témoin)
Staphylocoque	1	120
Colibacille	3	5
Bacille typhique	1	5
Bacille de Shiga	1	5
<i>Bacillus subtilis</i>	300	Plus de 360
Bacille tuberculeux	90	90
<i>Penicillium notatum</i> . . .	15	200

Rappelons que les chiffres indiquent le temps de survie en minutes des microbes en contact respectivement avec le distillat iodé et non iodé. Comme on le voit, l'iodation du distillat moruïque dans les conditions indiquées, provoque une augmentation considérable du pouvoir germicide de cette huile. Par contre, nous n'avons constaté aucune augmentation appréciable du pouvoir bactériostatique ou tuberculostatique du distillat iodé.

En ce qui concerne le bacille tuberculeux, nous devons attirer l'attention sur l'augmentation considérable du pouvoir tuberculolytique du distillat moruïque iodé [4 b]. En effet, des suspensions bacillaires dans le distillat iodé et non iodé, portées à l'étuve puis étudiées par des frottis faits toutes les semaines pendant un mois, montrent que les suspensions dans le distillat iodé sont considérablement lysées : les formes non acido-résistantes (substance cya-

nophile, bâtonnets, granules) y prédominent. Au contraire, les suspensions dans le distillat non iodé sont à peine lysées et les formes acido-résistantes normales y sont prédominantes.

ESSAIS DE TOXICITÉ. SOLUBILISATION DANS L'EAU.

Nous avons rencontré des obstacles considérables quand nous avons voulu passer de l'expérimentation *in vitro* aux essais sur l'animal, en l'occurrence le cobaye. En effet, l'injection de distillat au cobaye par voie sous-cutanée a occasionné localement, au point de l'injection, de volumineux abcès d'aspect caséux. Les émulsions stables que nous avons pu obtenir en ajoutant des solutions alcooliques de distillat à des solutions aqueuses de phosphates se sont montrées, à cause de leur forte teneur en alcool (à 1/5 ou 1/10), toxiques pour le cobaye neuf et encore plus pour le cobaye tuberculeux. Il a donc fallu renoncer à l'alcool et avoir recours aux solvants hydrosolubles (émulsof O, tween 80). Nous avons déjà montré qu'à l'aide de ces solvants, on peut solubiliser dans l'eau certaines huiles iodées ou non iodées et obtenir ainsi des solutions ou pseudo-solutions parfaitement limpides. Dans ces solutions, les huiles solubilisées se comportent comme des corps solubles dans n'importe quelle quantité d'eau [4 h]. Voici comment nous avons opéré pour obtenir une solution aqueuse de distillat moruïque :

1 cm³ de distillat iodé ou non iodé est dissous dans 10 cm³ du solvant suivant : émulsof O : 5 cm³ ; uréthane : 2,5 g. ; eau distillée : 2,5 cm³, puis on ajoute de l'eau distillée en quantité suffisante pour avoir la concentration voulue, en général 90 cm³ pour avoir une concentration de 1/100 de distillat. On ajoute à cette solution quelques gouttes de soude diluée, jusqu'à clarification complète. On a ainsi des solutions aqueuses de pH 7,2 ou 7,4 qui, comme les solutions aqueuses de l'huile de foie de morue ou de certaines autres huiles, sont parfaitement bien tolérées, aussi bien en injections sous-cutanées qu'en injections intraveineuses. Chez le lapin, nous avons pu injecter par voie veineuse jusqu'à 5 cm³ d'une solution à 1/50 de distillat sans observer le moindre incident pendant l'injection (embolie huileuse), ou dans les jours qui suivent celle-ci. Chez le cobaye, nous avons éprouvé la toxicité à long terme du distillat et de son solvant injectés par voie sous-cutanée à raison de 1 ou 2 cg. de distillat par jour pendant un mois et demi. Dix cobayes ont été ainsi traités et ont parfaitement bien supporté ce traitement, leur poids continuant à augmenter comme celui des cobayes témoins non traités. Ainsi, à des doses relativement élevées (2 à 4 cg. par kilogramme de poids vif) et répétées, le distillat moruïque, ainsi que son solvant, se sont montrés dénués de toxicité pour le cobaye.

L'absence de toxicité locale (pour la peau) du produit a été éprouvée au cours de nos essais de traitement par ce produit des lésions impétigineuses du cobaye. Nous aurons l'occasion d'y revenir un peu plus loin. Au cours de ces essais, nous avons constaté que le distillat moruïque bien désacroléiné n'exerçait sur la peau du cobaye aucune action irritante. Il nous a même paru favoriser le processus de cicatrisation des plaies cutanées.

ESSAIS THÉRAPEUTIQUES SUR L'ANIMAL.

Les expériences précédentes nous ont permis de conclure que le distillat moruïque et en particulier le distillat moruïque iodé étaient doués, *in vitro*, d'un pouvoir bactéricide très élevé et d'une action tuberculostatique non négligeable et non influençable par la présence de sérum dans les milieux de culture. Enfin, ces mêmes produits se sont montrés d'une innocuité à peu près absolue pour le cobaye, même à des doses relativement élevées. Ce sont ces conclusions qui nous ont incité à entreprendre les essais thérapeutiques suivants d'abord sur l'animal, puis sur l'homme.

a) IMPÉTIGO EXPÉRIMENTAL DU COBAYE. — Des cobayes reçoivent par injection intradermique 0,3 cm³ d'un mélange de cultures de streptocoque et de staphylocoque. La moitié des cobayes inoculés sont traités, immédiatement après leur infection, par une application (badigeonnage) quotidienne de distillat moruïque, alors que l'autre moitié sert de témoin. D'une façon générale, on observe que dans ces conditions, les lésions impétigineuses qui se développent au bout de quarante-huit heures environ chez tous les animaux, évoluent beaucoup plus rapidement vers la guérison chez les cobayes traités que chez les animaux témoins. En outre, on n'observe jamais, chez les animaux traités, d'adénopathies satellites inguinales ni de suppuration locale. On constate cependant, parfois, chez les animaux traités, une cicatrisation rapide de la peau avec de petites nodosités ou suppurations profondes, ce qui pourrait être dû à une pénétration insuffisante de l'huile dans les couches infectées profondes.

b) TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE DU COBAYE. — Disons tout de suite que les solutions aqueuses de distillat, compte tenu du faible pouvoir tuberculostatique du solvant, conservent, *in vitro*, à peu près intacte leur activité antituberculeuse. Par contre, la présence de ce solvant, l'émulsoy O, lui fait perdre toute activité bactériostatique vis-à-vis du streptocoque et du pneumocoque. C'est donc avec une solution aqueuse de distillat (à 1/100), dont l'activité antituberculeuse a été éprouvée *in vitro*, que nous avons entrepris

nos essais sur le cobaye tuberculeux. Notons aussi que ces solutions aqueuses de distillat permettent de mettre en évidence l'effet tuberculolytique du distillat iodé dont nous avons déjà parlé. A cet effet, des suspensions bacillaires (5 cg. de bacilles tuberculeux pour 5 cm³ de solution) dans des solutions à 1/100, 1/200, 1/400 et 1/800 de distillat iodé, sont portées à l'étuve en même temps que des suspensions bacillaires témoins dans des solutions équivalentes de solvant sans distillat. Au bout de quarante-huit heures, on constate que les suspensions bacillaires dans 1/100, 1/200 et 1/400 de distillat troublent fortement le milieu, alors que toutes les autres suspensions restent claires (dépôt bacillaire surmonté de solution parfaitement claire). Il ressort donc que les solutions aqueuses de distillat qui ont servi à traiter nos cobayes ne sont pas seulement tuberculostatiques, mais aussi tuberculolytiques. Elles dissolvent ou mettent en suspension certains des constituants bacillaires.

D'une façon générale, voici comment nous avons procédé dans nos essais sur le cobaye tuberculeux. Des cobayes tuberculisés avec 0,001 mg. d'une souche virulente de bacille humain (souche Knack), ont été traités immédiatement ou huit ou quinze jours après leur tuberculisation par l'injection sous-cutanée de 1 cm³ d'une solution à 1/100 de distillat iodé (parfois non iodé) par jour pendant un mois. Puis, un certain nombre d'animaux traités et non traités étaient sacrifiés et leurs lésions viscérales et ganglionnaires notées avec soin. On laissait les autres animaux mourir de tuberculose généralisée pour enregistrer, le cas échéant, la survie des traités sur les témoins non traités. De nombreuses expériences comprenant jusqu'à 25 à 30 animaux ont été effectuées, mais malheureusement elles n'ont pas permis des conclusions définitives. Alors que dans certains essais, la différence entre les lésions que portaient les animaux traités et non traités était particulièrement nette et fut confirmée par une survie moyenne de un mois environ chez les animaux traités par rapport aux animaux non traités, dans d'autres essais, effectués dans les mêmes conditions, les résultats étaient beaucoup moins nets. Nous n'avons pu encore déceler la cause de ces variations.

Cependant, ces expériences nous ont permis de constater que très régulièrement l'intradermo-réaction tuberculinique était négative ou faiblement positive chez les cobayes ayant reçu quotidiennement 0,1 cm³ de distillat pendant trois ou quatre semaines, alors qu'elle était fortement positive, en général, chez les cobayes témoins. Voici comment l'intradermo-réaction était pratiquée et les résultats constatés. Tous les cobayes recevaient dans la peau 0,3 cm³ d'une solution de tuberculine diluée à 1/10. Vers le quatrième jour, les résultats étaient très nets, puisque les animaux non traités présentaient en général des escarres considérables,

alors que les animaux traités avaient une réaction entièrement négative, ou tout au plus un peu d'œdème et parfois une toute petite escarre. Vers le huitième jour, mêmes constatations : chez les animaux non traités l'escarre n'était pas encore tombée, alors que chez les animaux traités tout était rentré dans l'ordre. On observe ainsi, chez les animaux traités par le distillat moruïque, une diminution de l'intensité et de la durée de la réaction tuberculinique. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence, chez ces animaux, une régression ou une aggravation de l'infection tuberculeuse pouvant justifier les résultats obtenus par l'épreuve tuberculinique. De même, nous ne croyons pas pouvoir attribuer ces faits à l'effet toxique de notre produit sur l'organisme du cobaye tuberculeux. La preuve en est, comme d'ailleurs nous l'avons signalé plus haut, que dans la majorité des cas, les animaux traités et non traités présentaient le même degré de tuberculose et mouraient dans les mêmes délais (deux mois en moyenne).

Cependant, dans quelques expériences, nous avons traité nos cobayes avec une dose double de distillat (0,02 g.). Nous avons alors constaté, chez ces animaux, une intradermo-réaction tuberculinique absolument négative et ceux-ci mouraient avec des lésions de tuberculose généralisée dans un laps de temps légèrement plus court (une semaine) que les animaux témoins. Dans ces expériences, le distillat moruïque, aux doses employées, s'est comporté comme un corps capable d'aggraver la tuberculose expérimentale du cobaye. Nous tenons à souligner que si cette aggravation par des doses relativement fortes de distillat peut être due à un effet toxique du produit, cette action toxique ne s'exerce que vis-à-vis du cobaye tuberculeux, le cobaye neuf se montrant, au mêmes doses, ainsi que nous l'avons déjà signalé, réfractaire à l'action toxique du distillat. Nous reviendrons un peu plus loin sur la signification de cette observation.

ESSAIS THÉRAPEUTIQUES SUR L'HOMME.

Les données expérimentales déjà exposées, qui ont démontré que le distillat moruïque, qui est une huile fortement bactéricide dénuée de toute toxicité pour le cobaye, est douée d'une certaine activité thérapeutique vis-à-vis des lésions impétigineuses de cet animal, nous ont permis d'entreprendre l'étude de son action thérapeutique sur l'homme. Nous avons d'abord essayé ce traitement sur un petit nombre de malades, puis sur une plus grande échelle, grâce à la collaboration étroite de quelques confrères qui ont bien voulu s'intéresser à nos travaux.

Nous avons déjà fait connaître, l'année dernière, les premiers résultats que nous avons obtenus en traitant certaines affections

cutanées par applications locales de distillat d'H. F. M. [4 i]. Nous avons alors attiré l'attention sur l'action très favorable de cette huile sur l'évolution de l'eczéma, les brûlures et de certaines infections de surface, y compris certaines mycoses rebelles à l'action de l'alcool iodé. Depuis, nous avons poursuivi nos essais de sorte que nous sommes à même, aujourd'hui, de faire le bilan de l'activité thérapeutique du distillat moruique iodé et non iodé sur plus de 50 cas d'eczémas rebelles et tenaces, sur un grand nombre de brûlures par coups de soleil et d'infections de surface.

Des eczémas tenaces, traînant depuis plusieurs années, parfois à peu près généralisés et prurigineux, ont été traités et rapidement guéris, malgré quelques récidives dans certains cas. Dès les premières applications de distillat (en général en pommade, parfois brut), les démangeaisons disparaissent ou diminuent considérablement, des croûtes se forment qui tombent en laissant une peau rougeâtre et souple ; d'une façon générale, après quinze à trente jours de traitement, la guérison est à peu près complète, sauf dans certains cas où, sans raison apparente, des récidives se produisent. Celles-ci sont d'ailleurs rapidement jugulées par le même traitement. Nous avons obtenu des résultats plus rapides et plus concluants avec le distillat iodé qu'avec le distillat simple.

Nous avons déjà signalé l'action bienfaisante du distillat moruique sur quelques cas de brûlure et de radiodermite et, en particulier, son action sur la douleur, la cicatrisation rapide des brûlures et l'absence de complications infectieuses. Nous avons eu l'occasion, l'été dernier, de traiter un grand nombre de brûlures par coups de soleil, dont quelques-unes du deuxième degré, extrêmement douloureuses et immobilisant les malades par suite de leur siège sur les membres inférieurs. Dans tous les cas, nous avons pu observer un apaisement rapide de la douleur, une cicatrisation qui nous a paru plus accélérée que de coutume et, bien entendu, l'absence d'infection.

De nombreuses infections de surface (panaris, impétigos, érythèmes fessiers du nourrisson, dermo-épidermites, mycoses, plaies infectées, etc.) ont été traitées par applications locales de pommade à 1/10 de distillat moruique iodé. L'action de la pommade nous a paru rapide et particulièrement efficace ; elle a pu devenir, dans certaines familles de nos connaissances, une sorte de pommade à tout faire, employée avec succès dans toutes sortes d'affections cutanées, y compris les plaies infectées ou non infectées (dans un but préventif). D'ailleurs, afin d'éviter, dans ce domaine des dermatoses cutanées parfois spontanément guérissables, toute appréciation exagérée et abusive de l'effet thérapeutique du distillat moruique, nous avons éprouvé son activité sur certains cas tenaces et rebelles, ayant résisté à l'action des sulfamides, de la pénicilline, des dérivés mercuriques ou même

de l'alcool iodé. Nous avons eu la satisfaction d'obtenir, dans ces cas, soit la guérison complète, soit une amélioration considérable, dans des délais raisonnablement courts.

Dans tous ces essais, la pommade employée était composée de 10 p. 100 de distillat moruque iodé, de 30 p. 100 de lanoline anhydre et de 60 p. 100 de vaseline. L'incorporation d'eau, même en faibles quantités, détruit assez vite l'activité de la pommade, même en présence de certains antioxydants tels que le parahydroxybenzoate de méthyle.

D'autre part, les effets désensibilisants du distillat moruque tels qu'ils ressortent de son action sur l'eczéma, ont été étudiés par J. Cabibel [2]. Après avoir confirmé l'activité thérapeutique de la pommade au distillat sur 6 cas d'eczéma, cet auteur a étudié l'action des solutions injectables ou de suppositoires de distillat moruque sur un certain nombre d'états de sensibilisation tels que l'urticaire, l'œdème de Quincke, certaines intolérances alimentaires, etc.

Il ressort de ces travaux que le distillat moruque peut désensibiliser l'organisme de façon durable et que son action bienfaisante peut s'étendre à des cas où l'élément sensibilisation est beaucoup moins net ; J. Cabibel rapporte, en effet, un certain nombre de dyspepsies dites nerveuses ou d'insuffisances hépatiques ayant bénéficié de l'activité thérapeutique du produit.

Dans un autre domaine, celui de la tuberculose, J. Cabibel a pu obtenir des résultats encourageants dans certaines formes mal définies de cette maladie, telles que l'imprégnation tuberculeuse ou « patraqueries de Burnand » [2 b]. 75 p. 100 de ces malades ont réagi favorablement et assez rapidement après un traitement de un mois et après avoir reçu en tout une douzaine de suppositoires contenant 1 deg. de distillat, à raison de 3 par semaine. Nous voudrions rapprocher, de ces faits, les observations de 4 primo-infections sévères et traînant depuis longtemps ; nous avons obtenu, chez ces enfants de huit à quatorze ans, une régression rapide de la fièvre et des signes généraux après trois ou quatre injections intraveineuses de distillat (à raison de 1 à 2 cc. par injection). Mais notons immédiatement qu'après chaque injection de distillat, nous avons observé un clocher thermique survenant dans les dix ou douze heures après l'injection, puis la température tombe à un niveau inférieur à celui précédant l'injection.

DISCUSSION.

Le trait dominant de l'activité thérapeutique du distillat moruque iodé est son activité anti-eczémateuse associée à de puissantes propriétés antibiotiques, ainsi que certains aspects de son activité antituberculeuse. Il nous est difficile, actuellement,

d'attribuer son activité anti-eczémateuse à telle ou telle de ses fractions. Cependant, soulignons que la plus grande partie du distillat moruïque est formée d'acides gras et que certains de ces acides sont déjà connus pour leur activité anti-eczémateuse (vitamine F). Rappelons aussi que, d'après H. Vincent [3], certains acides gras sont capables de neutraliser certaines toxines pour former avec elles des cryptotoxines. Nous avons montré, nous-même, avec quelle facilité les acides gras de l'huile de foie de morue [4 d], comme d'ailleurs les acides gras de son distillat, forment des complexes avec les protéines sériques ou les constituants du jaune d'œuf et perdent, de ce fait, un pouvoir bactériostatique considérable vis-à-vis du pneumocoque et du streptocoque. La fraction acide du distillat semble donc jouer un rôle essentiel dans l'activité anti-eczémateuse de celui-ci. Il se combine très vraisemblablement avec les toxines ou allergènes responsables de l'eczéma et leur fait perdre, de ce fait, toute activité pathogène.

Trois faits dominent l'activité antituberculeuse du distillat. *In vivo*, chez le cobaye tuberculeux traité par le distillat, il y a diminution considérable de la sensibilité à la tuberculine sans qu'une régression apparente de la tuberculose puisse justifier ce phénomène. Des faits analogues ont été signalés avec certaines sulfamides et, en particulier, avec la promine [4], et pour les expliquer on a surtout invoqué la toxicité de ces corps. Or, en ce qui concerne le distillat, si l'on voulait invoquer aussi sa toxicité, on serait obligé d'admettre que cette toxicité ne joue que pour le cobaye tuberculeux, le produit n'étant pas toxique pour le cobaye neuf. Chez l'homme tuberculeux (4 primo-infections), l'injection intraveineuse de distillat provoque des réactions thermiques que l'on n'observe guère chez l'homme sain non atteint de tuberculose. Il semble donc que le distillat, qui n'est pas toxique aux doses employées dans nos essais sur le cobaye neuf ou chez l'homme non tuberculeux, puisse devenir toxique, en tout cas pyrogène chez l'homme tuberculeux comme la tuberculine. Enfin, troisième fait important, le distillat moruïque et, en particulier, le distillat moruïque iodé, à l'état d'huile ou à l'état de solution aqueuse, est tuberculolytique ; il est donc capable d'attaquer le bacille de Koch et d'en libérer des substances qui, comme la tuberculine, pourraient être pyrogènes ou toxiques chez le sujet tuberculeux et capables de désensibiliser ou diminuer la sensibilité à la tuberculine.

Il existe donc des faits et un faisceau de présomptions qui nous permettent de penser que le distillat moruïque pourrait libérer *in vivo* chez le cobaye et chez l'homme tuberculeux, de la tuberculine provenant des bacilles de Koch qu'ils hébergent. Cette hypothèse peut être la cause de tous les faits que nous venons de

citer : toxicité du distillat pour le cobaye tuberculeux seulement, diminution de la sensibilité à la tuberculine, réactions thermiques chez l'homme tuberculeux. Le distillat moruïque devient, de ce fait, une arme à deux tranchants qu'on doit manier avec précaution. Ceci pourrait aussi expliquer les résultats très variables que nous avons obtenus chez les cobayes tuberculeux traités par le distillat dans les conditions déjà indiquées (tantôt amélioration, tantôt aggravation. En général, pas de résultats nets).

RÉSULTATS ET CONCLUSIONS.

Par distillation, ou mieux, par cracking de l'H. F. M. à la température de 250°, on obtient, dans certaines conditions, une huile caractérisée par ses constantes physiques et chimiques, et par des propriétés antibiotiques puissantes, germicides et bactériostatiques. L'iodation de cette huile a pour conséquence une augmentation considérable de son pouvoir germicide vis-à-vis de certains germes. Ainsi, en partant d'une huile très faiblement bactéricide, l'H. F. M., on obtient par distillation d'abord, puis par iodation, un distillat moruïque iodé considérablement plus bactéricide que l'huile de foie de morue qui lui a donné naissance.

L'étude des fractions acide et insaponifiable du distillat montre que le pouvoir germicide et tuberculostatique de cette huile est dû à sa fraction insaponifiable et que son pouvoir bactériostatique vis-à-vis du streptocoque et du pneumocoque est dû à ses acides gras.

Cette huile (le distillat) a été solubilisée dans l'eau et rendue injectable même par voie veineuse. Des essais sur le cobaye neuf non tuberculeux ont montré que ce produit est dénué de toxicité aux doses de 1 ou 2 cg. par jour administrées pendant un mois et demi.

La négativation de l'intradermo-réaction chez le cobaye tuberculeux traité par le distillat moruïque a été longuement discutée. Il existe des faits et des présomptions qui nous permettent de penser que le distillat moruïque pourrait libérer, *in vivo*, chez le cobaye et chez l'homme tuberculeux, de la tuberculine provenant des bacilles de Koch qu'ils hébergent.

Le distillat moruïque s'est montré doué d'une activité thérapeutique considérable dans les infections de surface et dans l'eczéma. Plus de 50 cas d'eczéma rebelle et tenace ont été traités et guéris par cet antibiotique. Le distillat iodé s'est montré supérieur au distillat non iodé. Dans d'autres domaines (désensibilisation par injections ou suppositoires, traitement de certaines formes de tuberculose et en particulier des primo-infections des enfants), une expérimentation plus poussée semble nécessaire avant d'arriver à des conclusions définitives, bien que les premiers résultats nous paraissent des plus encourageants.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SOLOMIDÈS (J.). a) *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **133**, 590 ; *ibid.*, 1945, **139**, 544 ; *ibid.*, 1946, **140**, 111 ; *Rev. Tub.*, 1945, **9**, 2111 ; *Ces Annales*, 1946, **72**, 156. — b) *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 751. — c) *Rev. Tub.*, 1946, **10**, 314 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 839. — d) *Ces Annales*, 1948, **74**, 72. — e) *Rev. Tub.*, 1946, **10**, 807. — f) *Ces Annales*, 1949, **76**, 371. — g) *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 1178. — h) *Ces Annales*, 1948, **74**, 331. — i) *Ces Annales*, 1948, **75**, 392 ; *La France Méd.*, 1948, **11**, n° 7, 6.
- [2] CABIBEL (J.). a) *La France Méd.*, 1948, **11**, n° 9, 11 — b) *Soc. de Méd. de Paris*, séance du 22 janvier 1949.
- [3] VINCENT (H.). *Bull. Acad. Méd.*, 1928, **100**, 782.
- [4] SMITH et Mc CLOSKEY. *Publ. Health. Reports*, 1945, **60**, 112.

DE QUELQUES RECHERCHES CONSACRÉES AU VIRUS DE LA MALADIE DE NEWCASTLE EN TUNISIE

PAR GEORGETTE CORDIER, JEAN CLAVIERAS et AZIZ OUNAIS

(Laboratoire de l'Institut Arloing, Tunis.)

I. — De l'obtention et du titrage du virus en vue de la préparation du vaccin.

La nécessité de faire face à une attaque meurtrière de la Maladie de Newcastle en Tunisie, par la préparation d'un vaccin, allait tout d'abord orienter les recherches vers l'obtention de quantités suffisamment importantes de virus, autre que celui fourni par les organes et produits pathologiques de volailles contaminées. Le virus de culture en embryons de poulets répondait à ce besoin.

Après avoir suivi un assez grand nombre de séries d'œufs incubés, ensemencés de virus local et avoir enregistré pour un même virus, dans une même série, des différences de comportement assez variables (certains embryons perdant plus ou moins leur vitalité en trente-six à quarante heures, d'autres exigeant un séjour plus prolongé : trois, quatre et cinq jours pour présenter les mêmes signes de vie ralentie), nous avons recherché si la simplification apportée par Lépine [1] à propos du virus grippal et qui consiste à retirer tous les œufs quarante-huit heures au plus après l'ensemencement d'un bon virus éprouvé, n'offrirait pas le même avantage dans la culture du virus de la Maladie de Newcastle.

Des essais furent envisagés dans ce sens et les récoltes successives furent comparées en fonction du résultat fourni pour chacune d'elles par l'épreuve de l'hémoagglutininabilité de Hirst [2], après que celle-ci eut été chiffrée par rapport à un virus de départ de titre infectieux connu pour la volaille et l'embryon de poulet.

Il nous a paru opportun, au moment où la pseudo- peste est signalée en de nombreuses contrées, de faire connaître aux chercheurs chargés d'étudier la production du virus et, concurremment, celle du vaccin, la méthode que nous suivons, en rapportant

quelques-unes des observations que nous avons été amenés à faire au cours de nos recherches.

TECHNIQUE. — La technique d'ensemencement est suffisamment connue : il s'agit d'œufs de poules fécondés incubés à 39°5-40° que l'on inocule le onzième jour, sur la chorio-allantoïde, après mirage, à la faveur d'une petite ouverture pratiquée à l'aide d'une fraise de dentiste.

L'inoculation s'effectue au moyen d'une aiguille courte de 5/10 de mm. fixée sur une seringue à tuberculation de 1 cm³ qui contient la suspension virulente, de titre connu, injectée à raison de 1/20 de cm³ par embryon. Après retrait de l'aiguille, l'orifice de la coquille est paraffiné. Les œufs sont alors replacés dans l'incubateur et mirés respectivement vingt-quatre et trente-six heures après, afin de retirer avant leur mort ceux des embryons qui offriraient une plus grande sensibilité au virus. A la quarante-huitième heure, tous les œufs restants sont extraits de la couveuse et portés, comme les précédents, à la glacière à +4°, où l'on prend soin de les placer debout, la chambre à air vers le haut.

Dès la sortie de la glacière, le lendemain, l'on procède à la récolte des liquides amnio-allantoïdiens. Lorsque l'opération est correctement conduite, l'aspiration dans la pipette provoque la montée d'un liquide clair, transparent, dont le volume peut atteindre 8 à 10 cm³.

Les prélèvements réservés à la constitution des souches de virus sont recueillis individuellement dans des tubes numérotés ; chacun fait en outre l'objet d'un ensemencement sur gélose et bouillon avant d'être placé à — 25°. Parallèlement, en vue du titrage, il est constitué, dans un tube à part, un mélange à parties égales (habituellement 1 cm³ pour chaque échantillon) de tous les liquides récoltés.

Chaque œuf est ensuite plus largement ouvert avec des ciseaux stérilisés, et tout le contenu restant est reçu dans une boîte de Petri stérile.

S'il s'agit d'une récolte destinée seulement à une préparation extemporanée de vaccin, les liquides amnio-allantoïdiens, aspirés comme précédemment, sont réunis dans un flacon commun préalablement taré.

Les embryons, ainsi que leurs membranes, sont séparés du vitellus et du blanc, placés dans un bocal stérile taré, pesés puis broyés au Latapie ; la pulpe obtenue est étendue de cinq fois son poids d'eau distillée, bien mélangée et filtrée sur fine mousseline.

Le matériel virulent habituellement retenu pour préparer le vaccin se compose de la pulpe ainsi diluée et du mélange également au 1/6 en eau distillée, des liquides amnio-allantoidiens correspondant aux embryons pulpés.

CONTRÔLE DE LA VALEUR DE LA RÉCOLTE.

Au cours de chaque préparation vaccinale se rapportant généralement à une récolte, il était de règle de titrer le pouvoir infectieux du matériel virulent. A cet effet, les doses de virus dilué à des taux différents étaient inoculées à des volailles saines soumises ensuite à un examen clinique attentif pendant le temps jugé nécessaire à l'évolution pesteuse. Déjà l'on pouvait augurer du degré de virulence du virus vaccinal pour l'oiseau, d'après les observations enregistrées au cours de la culture dans les embryons : un bon virus obligeant au retrait des œufs souvent après trente-six à quarante heures, un virus plus faible permettant un développement plus poussé des embryons, certains arrivant à éclosion.

Toutefois, nous étions à la recherche d'un moyen plus simple, moins onéreux que le passage sur la volaille, et tout aussi précis. La réaction d'hémoagglutination de Hirst, déjà exploitée par les chercheurs américains [3] pour des fins analogues, ne pouvait que répondre à ce but.

Il s'agissait d'établir une comparaison définitive entre les indications fournies par ce test et celles apportées par l'épreuve de virulence.

Les essais de titrage entrepris ont donc été les suivants :

1° Epreuve d'hémoagglutinabilité appliquée séparément aux divers éléments d'une même récolte.

Mélange des liquides amnio-allantoïdiens.

Mélange des pulpes embryonnaires.

Mélange des liquides amnio-allantoïdiens réunis aux pulpes embryonnaires en vue de constituer le virus vaccinal.

2° Epreuve d'infectiosité réalisée chez l'embryon et chez la volaille à partir de ces différents mélanges.

EPREUVE D'HÉMOAGGLUTINATION.

La méthode de Hirst, dont il a été tiré de nombreuses variantes, d'ailleurs sensiblement comparables, nous est apparue parfaitement au point à travers les travaux que Lépine et ses collaborateurs ont consacrés au diagnostic de la grippe. Notre protocole est la répétition du leur. Il nécessite deux éléments : le virus obtenu comme il a été dit précédemment et des hématies de poule en suspension à 0,5 p. 100 en eau salée à 8,5 p. 1.000 de chlorure de sodium. Chacune des réactions nécessitait une moyenne de 12 tubes, plus rarement 14 et 18.

La lecture s'effectuait après une heure et demie, en plaçant les

tubes au-dessus d'une simple glace ou miroir à main bien éclairé par la lumière du jour ou par une lampe électrique portable. Les différents aspects observés sont les suivants, selon qu'il s'agit de réaction positive, douteuse ou négative :



En général, l'interprétation n'offre aucune difficulté, et il est fréquent qu'à une réaction franchement positive succède, dans le tube suivant, une réaction franchement négative. Plus rares sont les intermédiaires étiquetés \pm (plus ou moins).

RÉSULTATS DES PREMIERS TITRAGES : ETUDE DE LA SOUCHE *a 2*.

La souche *a 2* qui, la première, a donné lieu à des recherches sur le pouvoir hémagglutinant du virus avipesteux, est d'origine tunisienne, isolée comme toutes celles qui ont été entretenues au laboratoire, par passage sur œufs à partir de virus rate ou de virus sang de volailles pesteuses. La souche *a 2* a pour point de départ un virus sérum de volaille malade sacrifiée en août 1948.

Isolée sur embryons en septembre et conservée pendant plus de deux mois en glacière à $+ 4^{\circ}$, cette souche est reprise pour des essais de culture sur œufs à partir de décembre ; elle fera désormais l'objet de passages successifs, ainsi que de presque tous les titrages dont les résultats sont résumés dans le tableau ci-après.

EPREUVE D'INFECTIOSITÉ.

Le pouvoir infectieux du virus et de la pulpe embryonnaire a été recherché à la fois pour l'embryon et pour la volaille sur les bases d'une inoculation de $0,05 \text{ cm}^3$ en injection sur la chorio-allantoïde pour le premier, intra-musculaire pour la seconde.

Pour tous les virus de pouvoir hémagglutinant égal ou supérieure à $1/512$, l'infectiosité s'est encore manifestée avec régularité jusqu'à la dilution $\frac{1 \times 10^{-9}}{6}$ avec mort après trois-quatre jours dans le cas des embryons, apparition de signes cliniques après quatre jours et mort en cinq jours dans le cas des oiseaux de basse-cour.

Dans des essais analogues, d'autres souches de virus de pouvoir

TABLEAU I.

DATE des ensemencements	NOMBRE d'embryons utilisés	NATURE DU VIRUS	TAUX D'HÉMOAGGLUTINABILITÉ		
			Liquide amnio- allantoidien	Pulpe embryonnaire	Virus vaccinal
23 janvier.	6	α^2 .	+ 1/1 024	+ 1/1 280	
30 janvier.	11	Virus α^2 récolté le 25 janvier.	+ 1/512	+ 1/5.120	
3 février.	17	Virus α^2 du 25 jan- vier.	+ 1/1.024	+ 1/1.280 \pm 1/2.560	
14 février.	26	Virus α^2 récolté le 1 ^{er} février.	+ 1/1 024	+ 1/640 \pm 1/1.280	
18 février.	25	Virus α^2 récolté le 16 février	+ 1/2 048	+ 1/5 120 \pm 1/10.240	
26 février.	23	Virus α^2 récolté le 1 ^{er} février	+ 1/3.072	+ 1/2 560	
14 mars.	21	Virus α^2 récolte le 28 février.	+ 1/1 024	+ 1/1.280	
15 mars.	23	Virus α^2 récolté le 1 ^{er} férier.	+ 1/1 024	+ 1/1.280	
28 mars.	25	Virus α^2 , recolte du 17 mars	+ 1/3 072	+ 1/24 476	+ 1/24.476
4 avril.	23	Virus α^2 , récolte du 17 mars.	+ 1/3.072		+ 1/6 144
11 avril.	7	Virus α^2 , récolte du 16 mars	+ 1/768	+ 1/1.536	+ 1/1.536
11 avril.	12	Virus α^2 , récolte du 16 mars.	+ 1/384 \pm 1/768	+ 1/3.072	
23 avril.	10	Virus α^2 , récolte du 16 mars.	(1) + 1/4.096	+ 1/3.072	
23 avril.	10	Virus α^2 , récolte du 16 mars.	+ 1/3.072		

héoagglutinant respectivement égal à 1/64 et 1/80 ont fait preuve d'un pouvoir infectieux beaucoup plus faible :

Virus titrant 1/64 à l'épreuve d'héoagglutination :
utilisé en dilution à 1 p. 5 sur 23 embryons d'un même lot ;
11 embryons ont succombé entre cinq et six jours, 12 poussins
ont éclos qui ont prouvé, deux mois plus tard, qu'ils étaient
sensibles au virus à l'égal de sujets neufs.

Virus titrant 1/64 à l'épreuve d'héoagglutination :
utilisé sur 6 volailles respectivement aux dilutions

$$1 \times 10^{-2}; 1 \times 10^{-5}; 1 \times 10^{-6}; 1/2 \times 10^{-6} \text{ et } 1/4 \times 10^{-6};$$

les 6 volailles n'ont manifesté aucun trouble.

Conclusions.

1° Le virus de la Maladie de Newcastle d'origine tunisienne
qui sert actuellement à préparer le vaccin antipesteux consiste

en une culture de quarante-huit heures d'âge sur des embryons de onze jours.

2° L'épreuve de l'hémoagglutinabilité est une réaction précieuse pour la mise en évidence rapide du virus de culture.

3° Les divers éléments d'une même récolte ne fournissent pas un chiffre identique en ce qui concerne le test de l'hémoagglutinabilité : habituellement, le mélange des pulpes embryonnaires accuse un taux plus élevé que celui des liquides amnio-allantoïdiens. D'un passage à l'autre, il existe également des différences ; toutefois, après 12 passages, il n'a pas été constaté de baisse progressive du pouvoir agglutinant.

4° Le pouvoir hémoagglutinant de ce virus n'est titrable que dans des limites relativement étroites : les taux maxima extrêmes ont atteint, suivant les récoltes, les valeurs 1/512-1/4.096 ; parallèlement, le pouvoir infectieux s'est révélé d'une très grande subtilité, puisque des dilutions à $\frac{1 \times 10^{-9}}{6}$ ont été reconnues virulentes à la dose de 1/20 de centimètre cube pour l'embryon.

5° Des virus qui n'avaient accusé que des taux très bas d'hémoagglutinabilité (1/64-1/80) n'ont pas davantage paru doués d'un pouvoir infectant considérable : le premier n'a réussi à infecter que 60 p. 100 des animaux à la dilution forte de 1/6 ; le second à la concentration de 1/100 n'a provoqué aucune réaction.

6° Les souches dont le pouvoir hémoagglutinant est au moins égal à 1/512 seront seules retenues pour la préparation de nos vaccins.

II. — De quelques observations au sujet de la réaction d'hémoagglutinabilité appliquée au virus de la Maladie de Newcastle.

L'emploi du test de l'hémoagglutination, soit comme test de la virulence du matériel servant à la fabrication de nos vaccins, soit comme test de diagnostic ou d'immunité de la peste aviaire lorsqu'elle est envisagée sous l'angle de l'inhibition, nous a amenés à faire certaines observations, que nous nous proposons de rapporter ici.

A. — ANOMALIES DE COMPORTEMENT DES HÉMATIES DE VOLAILLES.

Cette première observation fut la conséquence des résultats contradictoires que nous avons enregistrés lors de nos premiers essais ; période d'adaptation fort courte au demeurant, qui nous permit, par la suite, de nous convaincre de la fidélité du test. En effet, la réaction se présentait inversée par rapport à la description qu'en donnaient Hirst et ensuite Lépine et l'aspect du phénomène était à rapprocher d'une véritable agglutination micro-

bienné. Alors que, dans le tube témoin, les globules (provenant de la poule 132 encore neuve) étaient uniformément dispersés et occupaient une calotte hémisphérique en lui communiquant une teinte rose saumon, dans les autres tubes les globules se déposaient au fond en un amas très dense, rouge vif, avec des couronnes moins denses et parfois quelques petites plages blanches.

Recherchant quelle pouvait être la cause de cette anomalie, la réaction fut reprise cinq jours après, le 27 janvier 1949 :

1° En changeant seulement les hématies (hématies de la poule 132 remplacées par celles de la poule 202) ;

2° En changeant le matériel ainsi que les hématies (hématies de la poule 202 servant à l'expérience).

D'autre part, les hématies de la poule 132 qui avaient servi dans le premier essai (22 janvier 1949) furent reprises comme témoin d'un autre échantillon globulaire.

RÉSULTATS. — Les hématies de la poule 202 se comportèrent comme autoagglutinables, donc de façon anormale et la réaction fut encore inversée.

Cependant, un fait nouveau appela notre attention : le changement radical survenu dans le comportement des hématies de la poule 132 qui, auto-agglutinables dans l'expérience du 22 janvier, ne l'étaient plus cinq jours plus tard.

Une expérience en date du 17 février 1949, suivie d'une autre le 4 mars 1949, nous permirent de nous rendre compte du comportement variable de divers échantillons d'hématies et de la variation d'un même échantillon dans le temps.

La première portait sur le test d'inhibition des sérums de volailles infectées sur le point de mourir et de volailles vaccinées. Afin de choisir des hématies convenables, nous devions ponctionner 3 sujets neufs, coq n° 1, poule n° 2, coq n° 3, et enregistrer les résultats suivants :

Poule n° 2 et coq n° 3 : hématies auto-agglutinables.

Coq n° 1 : hématies normales présentant une sédimentation parfaite.

L'expérience du 4 mars 1949 avait pour but de rechercher le pouvoir inhibant :

1° De sérums de volailles vaccinées qui, récemment, avaient résisté à l'épreuve d'infectiosité ;

2° Des sérums de volailles normales qui avaient fourni des globules spontanément auto-agglutinables.

Simultanément, les hématies des sujets en expérience étaient éprouvées au point de vue de leur comportement.

Les résultats des réactions d'hémoagglutination et du test du pouvoir inhibant pour chaque échantillon de sang sont consignés dans le tableau II.

TABLEAU II.

NUMÉROS des volailles	ÉTAT DES SUJETS à l'égard de la peste aviaire	COMPORTEMENT des hématies	POUVOIR inhibant du sérum	NUMÉROS des volailles	ÉTAT DES SUJETS à l'égard de la peste aviaire	COMPORTEMENT des hématies	POUVOIR inhibant du sérum
130	Volailles vaccinées depuis 4 mois 1/2, éprouvées depuis 25 jours.	Normales.	Nul.	925	Vaccinée depuis 2 mois, éprouvée depuis 4 mois (paralyse consécutive).	Normales.	\pm 4/80
128		Faiblement auto- agglutinables.	\pm 1/40	Coq noir.	Sujet neuf.	Normales.	Nul.
918		Normales.	Nul.	3	Sujet neuf.	Normales.	Nul.
15	Vaccinée depuis 2 mois, éprouvée depuis 4 mois.	Auto-agglutinables.	Nul.	2	Sujet neuf.	Normales.	Nul.

Les préparations d'hématies des volailles conservées à la glacière servent à un nouveau contrôle le 5 mars 1949, car on cherche à utiliser celles qui se comportent convenablement pour des expériences de titrages ultérieures ; or, les hématies du coq n° 3 et les hématies « témoin » du coq n° 4, qui étaient normales le 4 mars, se révélèrent spontanément auto-agglutinables le 5 mars.

La même expérience, tentée le 7 mars sur les globules éprouvés le 3 mars, permit de constater que tous, sauf ceux du « coq noir », étaient devenus spontanément auto-agglutinables.

Pourquoi certains globules en tubes témoins prennent-ils l'aspect d'une réaction d'agglutination et non l'aspect normal d'une parfaite sédimentation ?

Ces globules ne seraient-ils pas imprégnés d'une substance qui les maintiendrait dans cet état de dispersion malgré les premiers lavages ? Subiraient-ils un changement du fait du contact prolongé en eau physiologique, contact qui parviendrait à diluer la substance ou à la faire disparaître ?

Cette première hypothèse semble infirmée par le comportement des globules de la poule 202 qui, mis à l'essai en vue d'un test d'hémoagglutination le 27 janvier 1949, s'étaient montrés anormaux et qui, repris le 1^{er} février, donc après une conservation de trois jours à la glacière, s'étaient comportés encore anormalement.

Pourrait-on expliquer le fait d'un retour à l'état normal comme la conséquence d'une propriété liée à une quelconque immunité ?

L'expérience du 4 mars (voir tableau précédent) vient mettre en défaut cette manière de voir. En effet, le coq n° 3 et la poule n° 2, dont les hématies s'étaient montrées auto-agglutinables le 14 février, sédimentaient normalement le 4 mars, et le pouvoir inhibant des sérums de ces mêmes volailles était nul.

Il ressort enfin de nos expériences que la vaccination des volailles contre la peste aviaire n'influence nullement les globules de tels sujets dans le sens d'une auto-agglutination. En effet, nous nous servons couramment, pour nos tests, de globules de sujets vaccinés, qui se sont révélés aussi satisfaisants que ceux provenant de volailles neuves.

En résumé, bien que restant dans le domaine de l'observation pure, et bien qu'aucune explication satisfaisante de ces phénomènes n'ait pu être trouvée, nous n'en estimons pas moins qu'il était intéressant de les signaler en tant que facteur capable d'influencer l'interprétation du test de l'hémoagglutination.

B. — COMPORTEMENT D'UN MÊME VIRUS EN PRÉSENCE D'HÉMATIES NORMALES DE DIFFÉRENTES POULES.

La technique de la réaction bien au point, il était naturel de contrôler sa fidélité en fonction du réactif « hématies normales » de poules.

Des résultats différents avec des hématies normales, mais d'origines diverses, eussent rendu difficile le choix d'hématies « étalons » et n'eussent pas été sans constituer un sérieux obstacle à la généralisation de la méthode. Fort heureusement, l'expérience ci-dessous rapportée est rassurante à cet égard, et si elle n'a point une rigueur mathématique, les résultats comparables qu'elle fait ressortir sont satisfaisants dans l'ensemble.

Un virus, déjà contrôlé le 5 mars 1949, est mis en présence de 4 échantillons de globules de poules différentes.

Le virus est primitivement dilué dans le même tube de départ pour éviter des erreurs provenant des 4 dilutions de tête de chaque série de tubes.

L'on obtient les réactions suivantes :

Coq 5	+ 1 256 ± 1 312
Coq 6	+ 1/312 ± 1/1.024
Poule 7	± depuis le 1 16 jusqu'au 1/312.
Poule 8	+ 1 312

A noter les anomalies présentées par la réaction avec les hématies de la poule 7, manque de netteté des agglutinations à partir du tube 3 jusqu'au tube 9.

Néanmoins, l'absence nette d'agglutination dans le tube 10 et les suivants marquant la même transition que dans les autres séries nous autorise à lui accorder la même valeur qu'aux autres réactions en tant que termes de comparaison d'une même expérience.

C. — COMPORTEMENT DE SÉRUMS

DE DIFFÉRENTES ESPÈCES ANIMALES A L'ÉGARD DU VIRUS PESTE AVIAIRE
EN PRÉSENCE D'HÉMATIES DE POULET.

L'expérience a porté sur les sérums des animaux suivants :

Cheval, mulet, âne, agneau, brebis, veau.

Elle avait pour but de mettre éventuellement en évidence le pouvoir inhibant propre à ces sérums.

RÉSULTATS :

Antigène + sérum cheval	± 1/40
Antigène + sérum mulet	± 1/40
Antigène + sérum ânesse	Pouvoir nul.
Antigène + sérum agneau	Pouvoir nul.
Antigène + sérum brebis	Pouvoir nul.
Antigène + sérum veau	Pouvoir nul.

On est en droit de conclure de cette expérience que le sang des animaux en cause ne possède pas normalement de pouvoir d'inhibition vis-à-vis du test d'hémoagglutination de la peste aviaire.

Nous avons eu la curiosité d'étendre la recherche d'un pouvoir inhibant dans les sérums du personnel occupé à la manipulation des volailles pesteuses et du virus pesteux.

L'expérience, conduite dans les mêmes conditions que la précédente, a fourni les chiffres suivants :

Antigène + sérum Cl.	+ au 1/80	± 1/160
Antigène + sérum T.	+ au 1/80	± 1/160
Antigène + sérum G. C.	+ au 1/40	± 1/80

Ces résultats tendent à démontrer la présence d'anticorps spécifiques dans les sangs étudiés.

D. — EFFETS DE LA PÉNICILLINE SUR LE VIRUS DE LA PESTE AVIAIRE.

La nécessité, d'une part, de n'utiliser pour les passages que des souches vérifiées stériles, le désir, d'autre part, de choisir les souches les plus virulentes, quelquefois en dépit de leur souillure, nous obligèrent à mettre en œuvre un procédé capable de débarrasser les liquides amnio-allantoïdiens, reconnus comme sources des meilleures souches, des germes qui les polluaient, tout en leur conservant intact leur pouvoir virulent.

A cet effet, nous eûmes recours, comme beaucoup de laboratoires, à l'action de la pénicilline, dont l'effet antibiotique est bien connu, pour les germes Gram + tout au moins.

La première expérience, en date du 11 mars 1949, consiste à déterminer la quantité nécessaire et suffisante pour inhiber le développement des germes figurés souillant le virus.

L'antigène est fourni par le mélange de 25 liquides amnio-allantoïdiens d'embryons infectés depuis quarante-huit heures, et que l'on répartit dans 3 tubes à hémolyse à raison de 1 cm³ par tube, le n° 1 servant de témoin, les 2 autres bénéficiant respectivement de l'addition de 5.000 et 10.000 U. O. de pénicilline diluée, de telle sorte que 1 cm³ représente 10.000 unités. Le volume final, dans chaque tube, est ramené à 2 cm³ par addition d'eau physiologique.

Les tubes sont portés à l'étuve à 35° pendant une heure ; puis remis à la glacière, et l'on procédera à des vérifications sur gélose en ensemençant une goutte de chaque préparation d'abord vingt-quatre heures, puis, ensuite, trente-quatre heures après l'action de l'antibiotique. L'examen des milieux de culture permet les constatations suivantes :

La quantité utile de pénicilline, fixée à 10.000 U. O. par centimètre cube, nous a toujours donné satisfaction.

L'influence de la pénicilline sur le virus, en ce qui concerne son pouvoir hémocoagulant, a été recherchée à diverses reprises, avec des résultats identiques desquels il ressort que l'antibiotique n'entraîne aucune modification du comportement du virus.

TABLEAU III.

	GÉLOSE + VIRUS TÉMOIN	GÉLOSE + VIRUS PÉNICILLINE (10.000 U. O.)	GÉLOSE + VIRUS PÉNICILLINE (5.000 U. O.)
Après 24 heures. . . .	19 colonies séparées.	0 colonie.	0 colonie.
Après 34 heures. . . .	Augmentation des colonies.	0	1 seule petite colonie.

C'est ainsi que deux virus avipesteux de titres hémagglutinants respectivement égaux à 1/1.024 et 1/2.048 ont conservé la même valeur à l'égard de l'hémagglutination après action de la pénicilline.

Dans les mêmes conditions d'emploi de l'antibiotique, le pouvoir infectieux n'a pas été davantage influencé ; le virus témoin infectant à la dose extrême de 1/20 cm³ dilué à 1×10^{-9} s'est montré égal à lui-même après avoir été soumis aux effets de ce corps.

En conclusion, l'usage de la pénicilline est à recommander comme procédé de choix pour purifier l'ultra-virus de la peste aviaire.

E. — DU COMPORTEMENT DES DIVERS ÉLÉMENTS VIRULENTS À L'ÉGARD DU TEST DE L'HÉMOAGGLUTINATION.

Dans nos premiers essais de préparation de vaccin, la recherche du pouvoir virulent du matériel employé, par le test de l'hémagglutination s'est avérée décevante lorsqu'il s'agissait du virus vaccinal total, alors qu'elle était régulièrement satisfaisante pour le liquide amnio-allantoïdien correspondant, ainsi que pour la pulpe embryonnaire seule.

Devait-on incriminer un facteur empêchant analogue à celui qui existe dans le sérum des oiseaux à la période ultime de la peste ?

S'il en était ainsi, pourquoi un tel facteur ne se serait-il pas manifesté de la même façon dans les différentes parties des embryons examinées séparément ?

La remarque faite à propos du titrage du virus vaccinal total devait nous conduire, logiquement, à vérifier le rôle du vitellus dans son comportement à l'égard du test de l'hémagglutination.

a) Cas où les hématies qui servent à la réaction sont normales :

b) Cas où les hématies utilisées sont spontanément auto-agglutinables.

Les éléments virulents provenant d'une récolte de 17 embryons

TABLEAU IV.

DATES des expériences	LIQUIDE allantoïdien taux d'agglutination	PULPE taux d'agglutination	VITELLUS taux d'agglutination	VIRUS vaccinal total taux d'agglutination
3 février . .	$+ 1/64 \pm 1/128$	$+ 1/80 \pm 1/160$	0	
28 avril . . .	$+ 1/768$	$+ 1/1\ 536$	$+ 1/96$	
2 mai . . .	$+ 1/6\ 124$			$+ 1/192$ (réactions atypiques).

de culture de quarante-huit heures ont, dans ce cas particulier, appelé les constatations suivantes :

TABLEAU V.

	DILUTIONS									
	10	20	40	80	160	320	640	1.280	2.560	5.120
Liquide amnio-allantoïdien .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pulpe	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Vitellus	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+

Si nous rapportons cette expérience, ce n'est point en tant que test capable de nous fixer sur le degré de virulence des divers éléments, mais pour montrer que, même avec des hématies de poulet anormales, le vitellus a toujours un comportement différent de celui du liquide amnio-allantoïdien et de la pulpe. Ici, le pouvoir empêchant du vitellus est très net dans les 8 premiers tubes, puis, brusquement, la réaction devient positive, simulant un phénomène de zone.

Conclusions.

1° Les hématies de volailles recueillies en vue de la réaction de Hirst se signalent parfois par des anomalies inconstantes de comportement qui se rencontrent aussi bien chez les sujets neufs que sur les individus vaccinés, ou éprouvés ou convalescents de peste. Il ne paraît pas exister de relation entre l'auto-agglutinabilité des hématies et le pouvoir inhibant du sérum correspondant.

2° Le pouvoir hémagglutinant d'un virus donné n'est pas influencé par l'origine des hématies (sujets neufs ou vaccinés) si celles-ci sont normales à l'épreuve préliminaire.

3° Les sérums normaux d'équidés, de bovidés et d'ovidés n'ont

accusé aucun pouvoir inhibant à l'égard du virus avipesteux. Le sang des expérimentateurs appartenant au laboratoire de la peste aviaire, par contre, a été reconnu porteur d'anticorps spécifiques.

4° La pénicilline est à recommander dans la purification du virus sans crainte d'altération du pouvoir hémagglutinant et du pouvoir infectieux.

5° Le vitellus fourni par des embryons utilisés à la culture du virus avipesteux accuse un pouvoir hémagglutinant très faible comparé à celui du liquide amnio-allantoïdien et de la pulpe embryonnaire correspondants ; l'influence du vitellus se retrouve dans le comportement du virus vaccinal total à l'égard de la même réaction d'hémagglutination.

III. — De l'adsorption du virus de la Maladie de Newcastle par l'hydrate d'alumine.

Moosbrugger, étudiant l'adsorption du virus aphteux par l'hydroxyde d'alumine [4], rapporte que ce corps peut adsorber le 1/3 de son poids de matériel virulent. Partant de ces données, cet auteur préconise une marge de sécurité de quinze fois la capacité adsorbante lorsqu'il s'agit de fabriquer un vaccin anti-aphteux du type Schmidt, Vallée, Waldmann. S'il importe que de telles considérations soient retenues dans ce cas, il n'est pas indispensable qu'il en soit de même, du moins nous le supposons, pour les vaccins aluminés, formolés au delà du seuil d'atténuation. C'est ainsi que nous préparons un vaccin contre la Maladie de Newcastle à l'aide d'un virus adsorbé par l'hydrate d'alumine et traité par le formol à 4 p. 1.000, dans lequel la quantité d'alumine est très inférieure à celle exigée par les auteurs du procédé vaccinal ci-dessus cité.

Notre vaccin est obtenu d'un virus de culture sur embryons de poulets, traité par le gel d'alumine préparé selon le procédé de Wilstätter et associés dans les proportions suivantes :

100 cm³ de suspension virulente au 1/6 sont mis en contact avec le précipité fourni par la centrifugation de 100 cm³ de la préparation d'hydrate d'alumine, ce qui représente sensiblement : 17,6 g. de gel hydraté (laissant 1,5 p. 100 d'extrait sec), pour 16,6 g. de matériel virulent.

Ces chiffres d'alumine sont ceux que nous avait révélés l'analyse chimique d'un précipité recueilli d'un vaccin anti-aphteux d'origine étrangère et que nous avons pris comme base.

Il importait que soient précisées les conditions de l'adsorption dans nos essais, et ce sont les résultats de recherches entreprises dans ce sens avec, comme moyens de contrôle : la détermination du pouvoir hémagglutinant et celle de l'infectiosité pour l'embryon, que nous allons exposer.

L'expérience a été réalisée à l'aide des éléments suivants :

1° *Matériel virulent* : Mélange des liquides amnio-allantoïdiens d'embryons de treize jours inoculés au onzième jour de leur développement à partir d'un virus caractérisé par un test d'hémo-agglutinabilité égal à 1/6.144 et un pouvoir d'infectiosité tel que 0,05 cm³ d'une dilution à 1×10^{-9} de la préparation vaccinale au 1/6 est encore capable de tuer l'embryon en trois ou quatre jours.

2° *Alumine* : Hydrate d'alumine préparé au laboratoire selon le procédé de Wilstätter et titrant 1,5 p. 100 d'extrait sec.

Préparation des complexes (alumine + virus).

Le virus a été divisé en trois échantillons soumis respectivement, le premier à une centrifugation à 3.500 tours pendant dix minutes, le second à l'action de la pénicilline, le troisième à une filtration sur bougie L₃.

Ces échantillons ont fait simultanément l'objet des mêmes essais d'adsorption réalisés comme suit :

TABLEAU VI.

	TUBE 1	TUBE 2	TUBE 3	TUBE 4
Hydrate d'alumine (précipité obtenu de la centrifugation de)	5 cm ³	5 cm ³	5 cm ³	5 cm ³
Eau physiologique	0 cm ³	2,5 cm ³	4 cm ³	4,5 cm ³
Virus au 1/6	5 cm ³	2,5 cm ³	1 cm ³	0,5 cm ³
Concentration correspondante en matériel virulent	Voisine de 1/6	Voisine de 1/12	Voisine de 1/30	Voisine de 1/60

L'opération était conduite aseptiquement dans des tubes à centrifuger munis d'un couvercle, bien agités à deux reprises pendant une demi-heure. Au bout de ce temps il était prélevé dans chacune des préparations à nouveau bien homogénéisées par agitation, un petit volume de 2 cm³ recueilli dans un tube à hémolyse. A raison de 4 concentrations pour un même échantillon de virus et du fait que l'expérience était réalisée à la fois avec le virus centrifugé, le virus pénicilliné et le virus filtré, le total des prélèvements partiels était égal à 12. Ces 12 petits tubes étaient centrifugés de manière à séparer éventuellement le complexe virus alumine du liquide ambiant. Le liquide surnageant le culot était-il virulent à l'égal des virus de départ ou s'était-il dépouillé partiellement ou totalement de sa virulence au profit de l'alumine ?

Les recherches à poursuivre sur ces liquides surnageants étaient de deux ordres :

- 1° Détermination du pouvoir hémagglutinant ;
- 2° Détermination du pouvoir infectieux pour l'embryon de poulet âgé de treize jours.

TABLEAU VII. — Recherche du pouvoir hémagglutinant des liquides surnageant les 12 complexes.

CONCENTRATION des préparations virulentes	VIRUS CENTRIFUGÉ Tubes						VIRUS FILTRÉ Tubes						VIRUS PÉNICILLINÉ Tubes					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
us témoins.	+ 1/6.144						+ 1/6.144						+ 1/6.144					

Tous les liquides surnageants apparaissaient dépourvus de pouvoir hémagglutinant. Qu'en était-il advenu de leur pouvoir infectant ? Celui-ci était recherché sur embryons de treize jours dans des conditions et avec des résultats que nous reproduisons dans le tableau ci-après. A noter que les liquides provenant du virus centrifugé n'ont pas été utilisés parce que souillés par des germes microbiens qui auraient pu fausser les interprétations. Tous les embryons ont reçu la même dose de 0,05 cm³ soit des liquides eux-mêmes, soit d'une dilution à 1×10^{-4} de ces divers liquides.

ADSORPTION DANS LE CAS OÙ LE MATÉRIEL VIRULENT
CORRESPOND AU MÉLANGE DES LIQUIDES AMNIO-ALLANTOÏDIENS
ET DES PULPES EMBRYONNAIRES D'UNE MÊME RÉCOLTE DE VIRUS.

Un tel matériel est celui qui entre habituellement dans la préparation des vaccins et que, pour cette raison, nous désignons par le terme « virus vaccinal ».

Le même protocole a présidé aux essais réalisés à partir de virus vaccinal, toutefois il n'y est fait mention que de deux échantillons : le virus vaccinal centrifugé et le virus vaccinal filtré sur bougie L₃.

En outre, ce dernier essai est agrémenté d'une expérience comparative portant sur deux préparations d'alumine : la première obtenue selon le procédé de Wilstätter, la seconde utilisée

TABLEAU VIII. — Recherche du pouvoir infectant des liquides surnageant les complexes obtenus à l'aide de virus filtré et de virus pénicilliné.

LIQUIDE SURNAGEANT le complexe correspondant à la concentration	VIRUS FILTRÉ	VIRUS NON FILTRÉ pénicilliné	VIRUS TÉMOIN	
			Dilutions	
1/6	2 embryons. { Mort au 11 ^e jour. Mort au 13 ^e jour.	2 embryons. { Mort au 14 ^e jour. Mort au 14 ^e jour.	1 × 10 - 3	1 embryon mort le 14 ^e jour.
Dilution à 1 × 10 - 4 du liquide ci-dessus	2 embryons. <i>Ecllosion normale.</i>	2 embryons. <i>Ecllosion normale.</i>	1 × 10 - 4	2 embryons mort au 14 ^e jour.
1/12	2 embryons. { Mort au 17 ^e jour. Un écloso normal- ement.	2 embryons. { 1 mort au 14 ^e -15 ^e jour. 1 mort au 15 ^e jour.	1 × 10 - 5	2 embryons mort au 14 ^e jour.
Dilution à 1 × 10 - 4 du liquide ci-dessus	2 embryons. <i>Ecllosion normale.</i>	2 embryons. <i>Ecllosion normale.</i>	1 × 10 - 6	2 embryons mort au 14 ^e jour.
1/30	2 embryons. { Un mort au 15 ^e jour. Une écloso nor- male.	1 embryon. { Mort au 16 ^e -17 ^e jour.	1 × 10 - 7	2 embryons morts au 15 ^e jour.
Dilution à 1/10 - 4 du liqui- de	2 embryons. <i>Ecllosion normale.</i>	2 embryons. <i>Ecllosion normale.</i>	1 × 10 - 8	2 embryons morts au 15 ^e et 16 ^e jours.
1/60	2 embryons. <i>Ecllosion normale.</i>	2 embryons. <i>Ecllosion normale.</i>	1 × 10 - 9	2 embryons morts au 15 ^e jour.

TABLEAU IX. — Résultats de l'épreuve d'hémoagglutinabilité.

NATURE DU LIQUIDE SURNAGEANT																															
Alumine W												Alumine type 2																			
Virus centrifugé Tubes de la réaction								Virus filtré Tubes de la réaction								Virus centrifugé Tubes de la réaction								Virus filtré Tubes de la réaction							
1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Accompagnant le complexe de dilution 1/6 .
Accompagnant le complexe de dilution 1/12 .
Accompagnant le complexe de dilution 1/30 .
Accompagnant le complexe de dilution 1/60 .

Virus témoin : dilution au 1/6. Virus centrifugé : + 1/6.144. Virus filtré : + 1/6.144.

TABLEAU X — Pouvoir infectant des liquides supernatants complexes au 1/30 obtenus avec virus vaccinal centrifugé et virus vaccinal filtré.

	VIRUS CENTRIFUGÉ	VIRUS FILTRÉ
Liquide surnageant	<div> <div>1 mort au 14^e jour.</div> <div>1 mort au 14^e jour.</div> </div>	<div> <div>1 mort au 17^e jour.</div> <div><i>Écllosion normale.</i></div> </div>
Dilution à 1×40^{-5} du liquide ci-dessus.	<div> <div>2 embryons.</div> <div>2 embryons.</div> </div>	<div> <div>2 embryons.</div> <div>2 embryons.</div> </div>

Virus témoin : mêmes t ux d'infectiosité que dans l'expérience se rapportant aux liquides amnio-allantoïd.ens.

par Goret [5] dans l'adsorption du virus de la Maladie de Carré et répondant à la formule suivante :

Alun de K : 10 g.; eau distillée : 105; lessive de soude : 7,8 cm³.

La quantité d'hydrate d'alumine qui entre dans la constitution de chaque complexe est toujours égale au précipité obtenu de la centrifugation de 5 cm³ de la préparation initiale d'alumine.

(Le protocole suivi est le même que celui de la page 2.)

Les tubes sont bien agités deux fois successivement pendant une demi-heure, puis centrifugés, et les liquides surnageant les culots sont examinés du point de vue de leur pouvoir hémagglutinant et infectant.

Conclusions.

Dans les conditions de nos essais, il apparaît :

1° Que l'agitation de préparations virulentes de virus amnio-allantoïdiens avipesteux (de titre hémagglutinant égal à 1/6.144) répondant aux concentrations 1/6, 1/12, 1/30, 1/60 sous un volume de 5 cm³ en présence chacune d'une égale quantité de précipité de gel d'alumine (précipité obtenu de la centrifugation de 5 cm³ de l'alumine de Wilstätter) fait disparaître le pouvoir hémagglutinant de chacun des liquides séparés par centrifugation du précipité correspondant. Dans le cas du virus vaccinal total (liquides amnio-allantoïdiens et pulpe embryonnaire) la réaction d'agglutination est seulement perceptible pour le liquide qui surnage le précipité correspondant à la concentration 1/6.

Le virus filtré dans chacune des séries accuse, par rapport au virus non filtré, une baisse de virulence reconnaissable seulement d'après l'épreuve de l'infectiosité dans le cas du liquide amnio-allantoïdien, et d'après cette épreuve ainsi que d'après la réaction d'hémagglutinité, dans le cas du virus total.

2° Que l'alumine formule Wilstätter est douée d'un meilleur pouvoir adsorbant que l'alumine obtenue à partir de l'alun de potassium.

3° Que le poids d'hydrate d'alumine qui préside à la constitution du complexe est insuffisant à adsorber tout le virus dans les différents cas examinés; toutefois, dans les préparations réalisées à l'aide des seuls liquides amnio-allantoïdiens, la quantité de virus non adsorbé qui resterait dans le liquide séparé du précipité provenant de la plus forte concentration virulente correspondrait tout au plus à une richesse en virus égale au 1/6 de 1×10^{-5} , puisque le pouvoir infectant du virus témoin est au moins égal au 1/6 de 1×10^{-9} et que le même liquide surnageant dilué à 1×10^{-4} a perdu tout pouvoir virulent.

En ce qui concerne le virus vaccinal, les mêmes considérations s'appliquent à une préparation de concentration 1/30.

Des études en cours nous permettront de comparer différentes formules de virus adsorbé, tant au point de vue de l'adsorption proprement dite que par les avantages à en tirer en matière de vaccination.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LÉPINE (P.), SAUTTER (V.) et REINÉ (L.). Ces *Annales*, 1946, **72**, 523.
- [2] HIRST (G. K.). *Science*, 1941, **94**, 22.
- [3] BANG, By (F. B.). *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 233.
- [4] MOOSBRUGGER. *Schweizer. Archiv. f. Tierheilkunde*, 1948, **90**, n° 1.
- [5] GORET (P.). Ces *Annales*, 1946, **72**, 53.

L'ACTION ANTIMÉTACHROMATIQUE DE LA STREPTOMYCINE

par W. MUTSAARS et L. LISON.

*(Laboratoires de Bactériologie et d'Histologie
de l'Université Libre de Bruxelles.)*

Nous avons signalé que l'effet lytique de l'alexine sur les globules rouges sensibilisés était inhibé par l'ester sulfurique de la cellulose, et que cette inhibition était levée par la streptomycine [1]. Dans cette même note, nous avons mentionné l'effet antimétachromatique de la streptomycine.

Nous avons examiné cet effet d'une façon plus approfondie. Rappelons que les colorants basiques dits métachromatiques teignent, comme le dit Ehrlich, « certains éléments histologiques en une nuance différente de celle de la solution colorante ». L'un de nous [2] a montré que certains esters sulfuriques de poids moléculaire élevé possédaient précisément cette propriété de modifier la nuance normale des colorants métachromatiques. Ces esters possèdent un pouvoir chromotrope.

C'est le cas, entre autres, de l'ester sulfurique de l'amidon ou de la cellulose (par abréviation ESA et ESC). Le bleu de toluidine possède en solution très diluée une teinte bleue. Cette teinte vire au rouge par addition de faibles quantités de sel de sodium ou de potassium de l'ester sulfurique de l'amidon.

Nous avons établi des mélanges de bleu de toluidine et d'eau distillée ou de bleu de toluidine et de solution en eau distillée d'ESA, de façon à obtenir uniformément une dilution finale du bleu de toluidine de M/50.000. Les solutions de bleu de toluidine métachromatique contiennent 6,66 γ d'ESA par centimètre cube. Enfin, en remplaçant des quantités appropriées d'eau distillée par des solutions en eau distillée de streptomycine, nous avons obtenu des mélanges de bleu de toluidine métachromatique contenant respectivement 1,66 ou 16,66 γ de streptomycine par centimètre cube, les concentrations indiquées ci-dessus de bleu de toluidine et d'ESA étant bien entendu respectées. L'eau utilisée au cours de ces essais a été fraîchement distillée dans un appareil en verre Pyrex, l'eau distillée ordinaire ayant fréquemment une influence fâcheuse sur la métachromasie.

Nous avons mesuré le coefficient d'extinction pour la lumière monochromatique de longueur d'onde s'échelonnant entre 400 et 700 $m\mu$ en nous servant d'un spectrophotomètre électrique de Coleman (1). Le coefficient d'extinction molaire s'obtient en divisant le coefficient d'extinction par la concentration du colorant, pour un trajet du faisceau lumineux de 1 cm. Plaçant ce coefficient d'extinction molaire en ordonnée, les longueurs

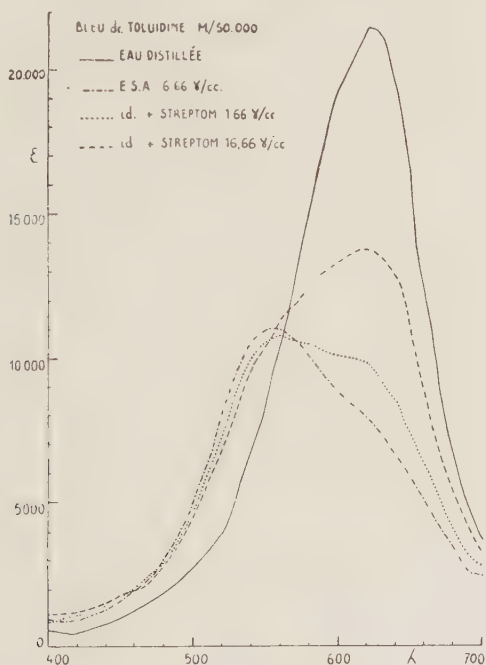


FIG. 1.

d'onde étant portées en abscisse, on obtient les graphiques suivants (fig. 1) :

Le bleu de toluidine en solution M/50.000 en eau distillée donne une bande d'absorption présentant un maximum vers 620 $m\mu$. L'addition de faibles quantités d'ESA modifie complètement l'aspect du graphique, le maximum se situant à présent vers 540 $m\mu$.

Cet effet n'est pas l'apanage exclusif des polysaccharides à groupements acides. Michaelis [3] a observé que l'oléate de

(1) Nous tenons à remercier M. le professeur P. Govaerts qui nous a autorisés à nous servir du spectrophotomètre Coleman de son service.

soude possède, à concentration appropriée, des propriétés analogues. Il en est de même en général pour les détergents à longue chaîne hydrocarbonée, possédant un groupement anionique à une extrémité. Alors qu'en eau distillée, une solution très diluée de bleu de toluidine donne une bande d'absorption très marquée vers 620 m μ (bande alpha de Michaelis), des quantités appropriées de ces substances dépriment et font même disparaître cette bande alpha qui est remplacée par une bande beta, caractéristique, d'après Michaelis, d'un agrégat bimoléculaire du colorant. Il peut même apparaître une bande gamma (vers 540-520 m μ) ; cette dernière est fort nette quand on utilise la gélose comme substance chromotrope. Cette bande serait l'indice d'un agrégat polymoléculaire. Cette bande gamma se manifeste aussi sous l'influence de l'ESA. Ceci n'a rien d'étonnant, la gélose étant d'ailleurs un ester sulfurique à poids moléculaire élevé.

Observons à présent le résultat de l'addition de faibles quantités de streptomycine. A raison de 1,66 γ par centimètre cube la bande gamma est à peine modifiée, mais la bande alpha réapparaît déjà de façon assez nette. L'addition de 16,66 γ par centimètre cube renforce cette tendance ; la bande alpha est cette fois-ci bien marquée, la bande gamma ayant à peu près totalement disparu.

Sous l'effet de l'ESA l'équilibre entre la forme monomère bleue et la forme polymère rouge du colorant envisagé, équilibre à l'avantage de la forme bleue, est déplacé dans le sens de la polymérisation.

La streptomycine a pour effet de dépolymériser le colorant. Déplace-t-elle le bleu de toluidine absorbé au niveau des groupements électropolaires négatifs des longues chaînes polysaccharidiques, de façon à libérer les molécules de bleu de toluidine ?

L'effet observé avec le bleu de toluidine peut se retrouver avec d'autres colorants métachromatiques. Nous avons, entre autres, étudié la thionine et le violet cristallisé.

La thionine, dont la teinte normale est bleu violacé, passe au rouge en présence d'une substance chromotrope (fig. 2). En solution diluée en eau distillée elle présente un maximum d'absorption vers 600 m μ . L'addition de faibles quantités d'ESA apporte les modifications suivantes : diminution considérable de cette bande sans toutefois arriver à sa suppression complète, apparition d'une bande d'absorption vers 480 m μ (que nous appellerons bande gamma par analogie avec le bleu de toluidine). Avec de faibles quantités de streptomycine on obtient un léger affaiblissement de la bande gamma, un léger renforcement de la bande alpha. En décuplant la dose de streptomycine on observe que la bande gamma s'aplatit, la bande alpha tend à se rapprocher de celle de la thionine pure.

Le violet cristallisé (fig. 3) en solution très diluée en eau distillée présente un maximum d'absorption vers 590 m μ (bande alpha). En présence de faibles quantités d'ESA on observe une atténuation considérable de cette bande et l'apparition d'une bande gamma dont le maximum se situe vers 520 m μ . Ici encore l'addition de streptomycine à la solution métachromatique modifie cet état de choses. Avec 1,66 γ la bande alpha redevient prépondérante par rapport à la bande gamma. Avec une quantité décuple

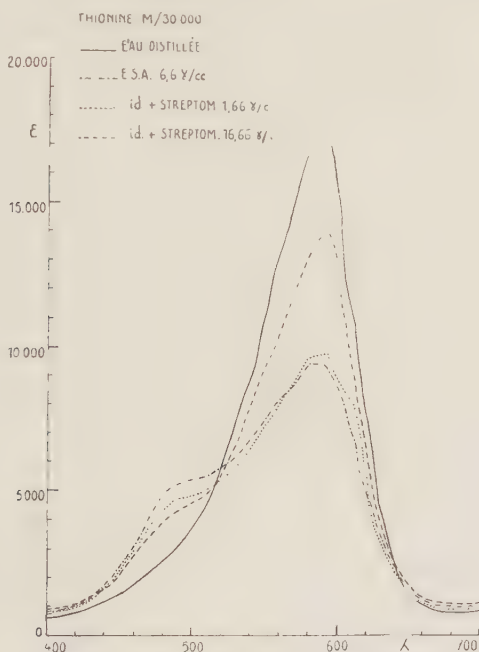


FIG. 2.

de streptomycine on obtient un graphique en tous points semblable à celui donné par le colorant en eau distillée ; il y a disparition complète de la bande gamma, la bande alpha atteignant en intensité, ou peu s'en faut, celle donnée par la solution témoin.

Nous avons observé antérieurement que le sulfate de protamine empêchait l'action inhibitrice de l'ester sulfurique de la cellulose sur l'alexine [4]. Nous retrouvons des graphiques très semblables à ceux obtenus par la streptomycine si nous remplaçons cet antibiotique par la protamine (fig. 4). L'addition de 0,06 γ par centimètre cube de sulfate de protamine modifie à peine le spectre d'absorption du bleu de toluidine métachromatique ; avec 0,66 γ par centimètre cube on obtient déjà un graphique indiquant une légère élévation de la bande alpha ; avec 6,66 γ par centimètre cube, le

graphique est à peu près superposable à celui fourni par le bleu de toluidine en solution dans l'eau distillée. Remarquons cependant une assez forte différence dans la zone des courtes longueurs d'onde, due probablement à une légère coloration de la solution de sulfate de protamine.

La streptomycine et la protamine possèdent toutes deux un

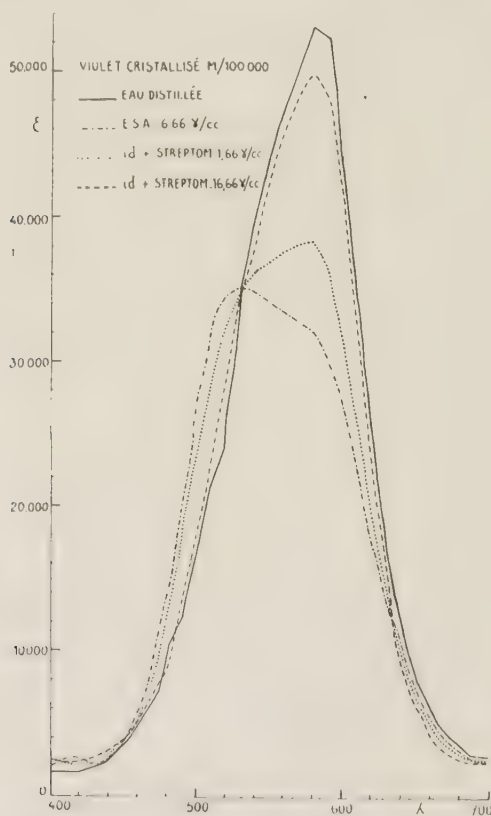


FIG. 3.

caractère basique, qui leur permet de réagir avec les groupements électropolaires négatifs de l'ESA et d'avoir un effet antimétachromatique. Par conséquent, nous nous permettons d'insister sur ce point, l'effet antimétachromatique de la streptomycine n'est pas du tout caractéristique de cette substance.

Nous avons exécuté quelques mesures en remplaçant l'ESA par de l'héparine, autre ester sulfurique polysaccharidique et par conséquent également chromotrope. Nous disposons de Liqueurmine « Roche », produit livré sous forme de solutions titrant

10.000 unités anticoagulantes par centimètre cube et présentant une teinte jaunâtre assez marquée. Ceci explique l'allure un peu particulière des graphiques (fig. 5), bien que la Liquémine ne se trouve qu'à la concentration de 4 unités anticoagulantes dans les solutions soumises à l'analyse spectrophotométrique.

Nous remarquons l'effet chromotrope considérable même à cette

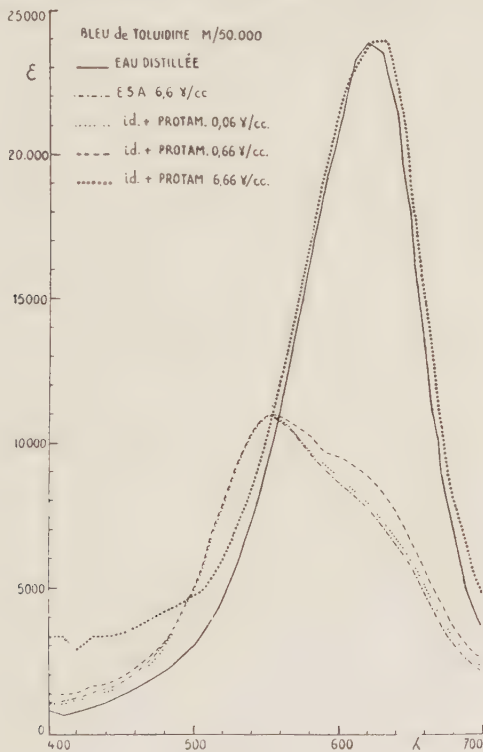


FIG. 4.

faible concentration, et l'effet antimétachromatique de la streptomycine.

Nous avons signalé [4] que l'ester sulfurique de la cellulose et la streptomycine mélangés en proportions appropriées donnent naissance à un précipité abondant. Ainsi que le signalent Rybak et Gros [5], la streptomycine est capable de former d'autres complexes. Ces auteurs ont, en effet, observé l'apparition de complexes insolubles en mélangeant cet antibiotique à de l'acide tannique, à de la céphaline, ainsi qu'à de l'acide oléique et palmitique. De même Massart, Peeters, Deley, Vercauteren et Van Houcke ont observé la formation de complexes entre les nucléo-

protéides dans la levure d'une part, et, d'autre part, des colorants basiques (trypaflavine) ou la streptomycine [6, 7].

Nous avons eu l'occasion de constater que la présence de bleu

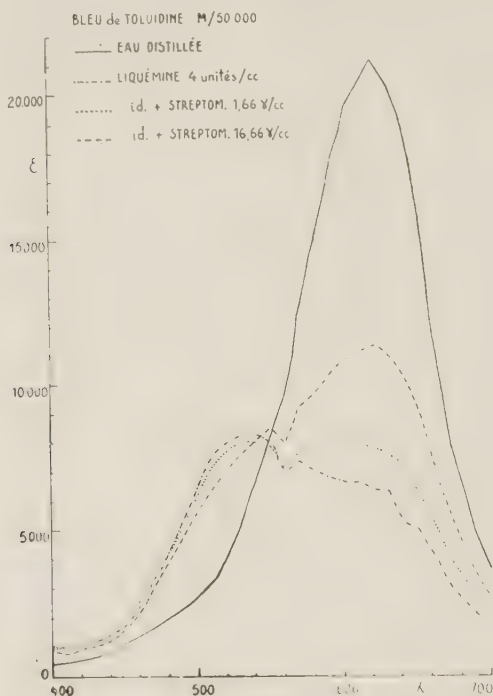


FIG. 5.

	NUMÉRO DU TUBE										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	10	15
	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³
Streptomycine à 2,5 γ/cm ³	0	0,8	1,6	2,4	3,2	4	4,8	5,6	6,4	8	12
Eau	8	7,2	6,4	5,6	4,8	4	3,2	2,4	1,6	0	6,8

	NUMÉRO DU TUBE										
	20	25	30	35	40	50	60	70	80	90	100
	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³
Streptomycine à 25 γ/cm ³	1,6	2	2,4	2,8	3,2	4	4,8	5,6	6,4	7,2	8
Eau	6,4	6	5,6	5,2	4,8	4	3,2	2,4	1,6	0,8	0

de toluidine favorisait l'apparition de ces précipités. Il en est vraisemblablement de même pour les autres colorants basiques.

Préparons trois mélanges de bleu de toluidine métachromatique contenant des quantités croissantes de bleu de toluidine, soit du bleu à 1,5 M/10.000, à M/20.000 et à M/40.000 à raison de 120 cm³ par mélange, auquel on ajoute une quantité, identique pour les trois mélanges, d'ESC, soit 80 cm³ à 1/20.000.

Avec ces trois mélanges nous formons trois séries correspondantes A, B et C de tubes, chaque tube contenant 4 cm³ du mélange. Ajoutons à chacune de ces séries des quantités croissantes de solution de streptomycine, suivant le tableau ci-contre, en maintenant les volumes constants par addition de quantités appropriées d'eau distillée.

Ces trois séries sont examinées après séjour de vingt-quatre heures à la température du laboratoire. Notons tout d'abord que l'on n'observe aucun précipité dans les tubes numérotés de 1 à 15, aussi n'en faisons-nous pas mention dans le tableau ci-dessous :

	NUMÉRO D'ORDRE										
	20	25	30	35	40	50	60	70	80	90	100
Série A. Bleu 1,5 M/10.000 . . .	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Série B. Bleu M/20.000 . . .	0	0	0	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Série C. Bleu M/40.000 . . .	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Les quantités de streptomycine et d'ESC en présence ne suffisent pas à la formation d'un précipité, c'est ce que montre la série C. Mais si l'on augmente la teneur des mélanges en bleu de toluidine on obtient un précipité très net (séries A et B). Ce précipité est constitué par de gros flocons colorés en violet. Il est vraisemblable, en ce qui concerne la série C, que la streptomycine présente ne suffit pas à inactiver les groupements électropolaires de l'ESC, groupements qui, par leur caractère hydrophile, contribuent certainement au maintien en solution de la grosse molécule polysaccharidique. Dans cette même série C, l'action adjuvante du bleu de toluidine est insuffisante pour inactiver les groupements non touchés par la streptomycine. Ce n'est pas le cas pour la série B ou A. Dans ces séries, les quantités de bleu de toluidine suffisent à abaisser le nombre de groupements électropolaires libres de l'ESC jusqu'en dessous de la limite critique de floculation.

Dans les expériences dont les résultats sont exprimés dans le

graphique de la figure 6, l'action antagoniste de la streptomycine sur la métachromasie a été étudiée en suivant l'effet de doses croissantes de streptomycine sur la densité optique du colorant pour une longueur d'onde déterminée. Celle-ci a été choisie de telle sorte que la variation observée soit la plus grande possible : en pratique, la longueur d'onde la plus favorable correspond à peu près à celle du maximum d'absorption du colorant pur. Pour le bleu de toluidine, nous avons donc choisi la longueur de 620 m μ et pour le violet cristallisé, celle de 580 m μ . A des solu-

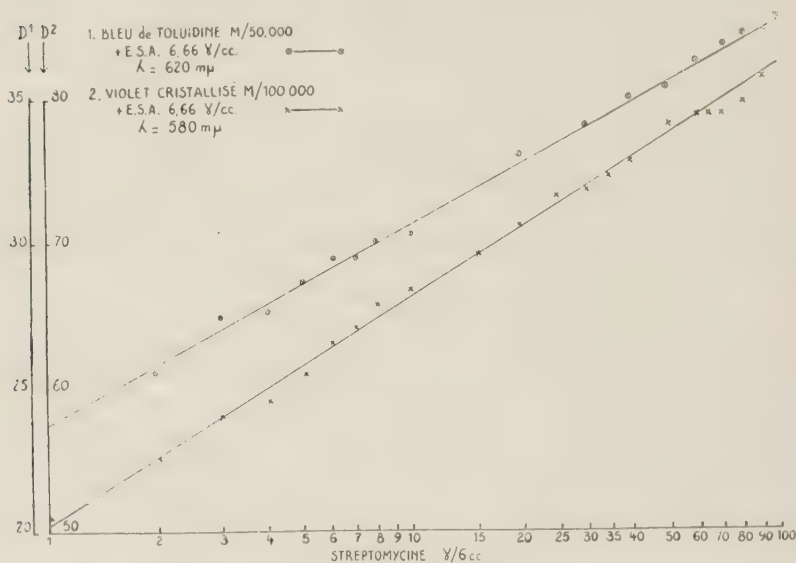


FIG. 6.

tions de bleu de toluidine M/50.000 et de violet cristallisé à M/100.000, on a d'abord ajouté 6,66 γ par centimètre cube de ESA, de façon à obtenir la forme métachromatique du colorant, puis on y a ajouté des quantités croissantes de streptomycine. Dans ces conditions, l'on observe que la densité optique augmente et tend à rejoindre celle du colorant pur. Une faible addition de streptomycine produit un effet accentué, tandis que les additions successives produisent un effet de moins en moins marqué. L'allure du graphique que l'on obtient ainsi rappelle celle d'une isotherme d'adsorption. C'est pourquoi nous avons exprimé les résultats en coordonnées semi-logarithmiques : en abscisses ont été portés les logarithmes des concentrations en streptomycine et en ordonnées les densités optiques. L'on constate que les résultats s'alignent suivant une droite.

Nous nous abstiendrons de tirer des conclusions de cette observation au sujet du mécanisme exact de l'action de la streptomycine. En effet, la courbe représentative du phénomène n'est une ligne droite que dans les limites de concentrations expérimentées ; il est certain que pour des concentrations plus hautes ou plus basses, il ne doit pas en être de même. En effet, la densité optique ne décroît pas indéfiniment avec la concentration en streptomycine, puisque sa limite inférieure est celle du mélange colorant + ESA ; de même, elle ne peut croître indéfiniment, puisque sa limite supérieure est celle qui correspond au colorant pur. Par conséquent, en coordonnées semi-logarithmiques, la courbe représentative du phénomène doit se raccorder aux valeurs limites par des branches voisines de l'horizontale et l'ensemble doit dessiner un S très allongé. La droite représentée par le graphique ne peut donc être que la partie médiane de cette courbe.

RÉSUMÉ.

1° La streptomycine possède un pouvoir antimétachromatique.

2° L'examen spectrophotométrique des solutions contenant des quantités variables de streptomycine, l'ESA restant constant, permet d'obtenir des graphiques rappelant ceux d'une isotherme d'adsorption.

3° Les mélanges streptomycine et ESA ou ESC flocculent, le bleu de toluidine favorise la floculation.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 1441.
- [2] *Arch. Biol.*, 1935, **46**.
- [3] *Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology*, 1947, **12**, 131.
- [4] *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 709.
- [5] *Experientia*, 1948, **4**, 396.
- [6] *Experientia*, 1947, **3**, 288.
- [7] *Arch. Int. Pharm. et Thérap.*, 1947, **75**, 210.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 1^{er} décembre 1949.

Présidence de M. MAGROU.

PRÉSENTATION D'OUVRAGE

M. Lépine. — J'ai l'honneur de présenter à la Société Française de Microbiologie, au nom de leurs auteurs, MM. J.-C. Levaditi et B. Kreis, les *Techniques de Laboratoire en Pneumologie* (1).

Conçu dans un esprit technique et didactique par deux auteurs qui ont une longue expérience de la question, cet ouvrage rendra les services les plus précieux aux laboratoires de diagnostics, aux travailleurs de recherche et aux cliniciens désirant garder un contact avec le laboratoire.

L'exposé des méthodes de laboratoire employées en pneumologie ne se limite pas à la seule recherche du bacille tuberculeux, question qui a été traitée avec toute l'étendue désirable.

Les méthodes appliquées aux affections à spirochètes ou à virus de l'appareil pulmonaire, la cytologie et le diagnostic du cancer, l'histologie, l'allergie et la sérologie appliquées aux maladies de l'appareil respiratoire, sont traités en détail et comprennent les techniques les plus récentes.

Plusieurs de leurs collègues de l'Institut Pasteur et des Hôpitaux ont concouru avec les auteurs à la rédaction de certains chapitres spécialisés.

Cet excellent manuel aura sa place sur la table de tout laboratoire touchant de près ou de loin à la pneumologie clinique ou expérimentale.

OUVRAGES REÇUS

G. E. Delory. — *Photoelectric methods in clinical biochemistry*, Hilger et Wette, London, 1949, 15 s.

(1) J.-C. LEVADITI et B. KREIS, *Techniques de Laboratoire en Pneumologie*, Éditions Médicales Flammarion, Paris, 1949, 760 francs.

Excellente et très complète mise au point de l'emploi des cellules photoélectriques en chimie biologique, avec les bases physiques et mathématiques permettant l'étude de leurs applications.

P. L.

J. Shafar. — *The vitamins in medical practice*, Staples press, London, 1949, 25 s.

Etat actuel sous une forme condensée des notions expérimentales et cliniques touchant aux différentes vitamines. Clair et excellemment résumé, l'ouvrage comporte une liste de références portant sur 1684 ouvrages cités, plus un addendum sur les développements les plus récents.

P. L.

J. Needham et E. Badwin. — *Hopkins and Biochemistry, 1861-1947*, W. Heffer and sons Ltd., Cambridge, 1949, 18 s.

Cet ouvrage, qui constitue le livre jubilaire du professeur F. G. Hopkins, renferme une autobiographie de Hopkins, des extraits de ses travaux et les contributions de ses élèves. Il sera lu avec intérêt par tous les admirateurs du célèbre biochimiste.

P. L.

Ch. Browning et T. J. Mackie. — *Textbook of Bacteriology*, Oxford University Press, London, 1949, 50 s.

Voici sous une forme modifiée la 11^e édition du *Manuel de Bactériologie* de Muir et Ritchie. Excellent ouvrage à l'usage des étudiants, clair et abondamment illustré, il nous revient fortement revu et augmenté notamment dans les chapitres qui traitent l'immunité, les maladies à virus, la chimiothérapie, etc. En fait, le manuel primitif est devenu peu à peu un véritable traité de bactériologie. Une bibliographie sommaire doit théoriquement permettre à l'étudiant de remonter aux sources citées, bien qu'en fait le simple renvoi aux éditions récentes des traités spécialisés mette à la disposition des chercheurs des sources plus abondantes et plus complètes. Dans l'ensemble, on ne peut que féliciter les auteurs de leur tâche, qui assure à l'œuvre la suite d'un succès depuis longtemps confirmé.

P. L.

K. Mather. — *Biometrical Genetics*, Methuen, London, 1949, 18 s.

Ce petit livre, clair et bien présenté, traite en détail sous l'angle mathématique toutes les questions de la génétique. C'est le plus complet que nous ayons vu sur ce sujet : il sera un outil indispensable aux généticiens même les plus familiarisés avec cet aspect de la question.

P. L.

COMMUNICATIONS

ÉTUDE DE LA PREMIÈRE SOUCHE FRANÇAISE DE *Cl. BOTULINUM D*

par A. R. PREVOT et E. R. BRYGOO.

A notre connaissance aucune souche de *Cl. botulinum D* n'avait encore été isolée en France. L'étude que l'un de nous (1) avait faite du type D n'avait pu être réalisée que grâce à deux souches provenant d'Afrique du Sud et à une autre souche provenant de Belgique, aimablement envoyée par le professeur Willems qui l'avait isolée d'un cas de mal d'Aiseau. On connaît les beaux travaux de ce dernier (2) qui a identifié le mal d'Aiseau au botulisme équin et réalisé un sérum anti-botulique D très actif. Avec la souche belge nous avons pu obtenir sur cheval un sérum anti-D qui a été efficace dans plusieurs manifestations du syndrome méningo-encéphalique sévissant actuellement dans les écuries françaises et ayant pu ainsi être identifié indirectement au botulisme équin D. Toutefois, la preuve directe de cette identification n'avait pas encore pu être faite, car toutes les tentatives d'isolement du germe avaient échoué du fait que le prélèvement n'avait jamais pu être pratiqué suffisamment tôt après la mort. Récemment, une enzootie du botulisme équin survenue au Catelet (Aisne), nous a été signalée par le D^r vétérinaire Bauduin et très peu de temps après la mort de l'un des chevaux atteints, nous avons pu obtenir un fragment de foie prélevé stérilement. En vingt-quatre heures, par la gélose profonde V. F. glucosée, nous isolions une souche très toxique de *Cl. botulinum D* qui existait à l'état de pureté dans le foie. Morphologiquement, cette souche est exactement semblable aux souches africaines et belge ; notons que dans dans les premières cultures le *Clostridium* montrait de nombreuses condensations chromaffines à l'intérieur du corps bactérien qui disparurent au cours des repiquages. La thermorésistance des spores est faible : une minute à 100°. Les cultures sont gazogènes et d'odeur rance. En gélose profonde, les colonies sont petites, ouatées. Le bouillon glucosé est rapidement troublé et se dépose en vingt-quatre heures. Le lait est coagulé en trois jours et non digéré. La gélatine est liquéfiée en vingt-quatre heures. Les protéines coagulées sont peu touchées. Le glucose, le galactose, le lactose et l'amidon sont fermentés. Les nitrates ne sont pas réduits. Le rouge neutre n'est pas réduit ; seules la phénosafranine et la safranine sont temporairement réduites. Les acides volatils produits sont : acétique et butyrique. Les autres substances produites sont : amines volatiles, alcools, cétones, NH₃ et SH₂.

Pouvoir pathogène. — La culture de vingt-quatre heures tue le cobaye en douze heures avec les mêmes lésions que celles que provoque la

(1) A.-R. PREVOT et P. ROSSI, *Bull. Acad. Vétér.*, novembre 1948, 386. - A.-R. PREVOT, *Bull. Acad. Vétér.*, novembre 1948, 390.

(2) R. WILLEMS, *Acta Biol. belgica*, 1941, 3, 353 et 356 ; *id.*, *Ann. Méd. Vétér.*, février 1942.

souche belge (œdème hémorragique local, tympanisme intestinal, lésions stomacales).

Toxine. — Les cultures en bouillon glucosé renferment au sixième jour d'incubation à 33° une toxine très active tuant le cobaye au 1/10.000 de centimètre cube et la souris au 1/100.000 de centimètre cube, avec les symptômes classiques du botulisme expérimental : paralysies flasques, surtout du cou et de la nuque, aphonie, paralysie de la déglutition, salivation. Cette toxine est entièrement neutralisée par le sérum antibotulique D, préparé à Garches avec la souche belge, à raison de 0,05 cm³ contre 100 DMm après un contact minimum de trois heures. Au contraire, les sérums anti-A et anti-B n'ont aucune action sur elle.

Cette toxine est détruite par un chauffage de cinq minutes à 100°, mais non complètement par un chauffage d'une minute à 100°.

Etant donné l'importance de la pathogénie du botulisme équin dont l'origine pour Geurden serait l'ingestion de fourrage infecté de spores de *Cl. botulinum* D (3), pour d'autres (4), l'ingestion de cadavres d'animaux morts de botulisme dans les granges à fourrages, question très discutée, nous avons voulu voir si cette toxine se formait en milieu d'origine végétale. Pour cela, nous avons utilisé la bouillie de marron d'Inde (*Aesculus hypocastaneus*) utilisée par l'un de nous pour la culture et l'entretien des anaérobies pectinolytiques (5). Nous avons vu que *Cl. botulinum* D pousse très rapidement et très abondamment sur ce milieu, qu'il y donne une fermentation gazeuse ; au deuxième jour la toxine tue déjà la souris au 1/1.000 de centimètre cube ; l'hémolysine coexiste, titrant DHm = 1/20 de centimètre cube. D'autre part, une simple décoction de luzerne permet d'obtenir une toxine active. Ainsi l'origine végétale de la toxine est prouvée et la pathogénie du botulisme équin D peut bien être rapportée au « forage poisoning » : en effet, l'ingestion de toxine par la souris provoque en quarante-huit heures un botulisme expérimental typique, mortel en trois jours.

La toxine en bouillon de six jours centrifugé, est facile à précipiter par SO₄(NH₄)₂ à saturation ; desséchée et pulvérisée, elle se conserve à la glacière. La DMm de cette toxine sèche est 0,0001 mg. (soit 1/10 de gamma).

Cette toxine est facilement extraite des corps microbiens de six jours par la méthode de Raynaud (6) [action du mélange citrate-chlorure de Na] appliquée pour la première fois par l'un de nous (1) à une toxine botulique. Si on place cette toxine après dialyse à la température de -5°, il se produit une congélation fractionnée qui concentre la toxine dans le liquide opalescent non solidifié ; alors que la partie congelée tue la souris au 1/50.000 de centimètre cube, la partie restée liquide la tue au 1/1.000.000 de centimètre cube. Ce phénomène de concentration d'une toxine par congélation fractionnée avait déjà été vu par divers auteurs, en particulier pour la toxine diphtérique. Au cours de cette congélation, dès que les premiers

(3) GEURDEN, *Cah. Med. Vétér.*, 1949, **18**, 109.

(4) STERNE et WENTZEL, *Congrès Intern. Vétér.*, Londres, 1949.

(5) A.-R. PRÉVOT (travail inédit).

(6) M. RAYNAUD, *VIII^e Congrès de Chimie biologique*, 1948.

glaçons apparaissent, le liquide opalescent commence à flocculer. Quand on extrait les glaçons, le flocculat se redissout et l'opalescence augmente. Il est possible que ces faits puissent permettre d'élaborer un fractionnement de la toxine botulique D en vue de sa purification.

Ainsi, la différence essentielle qui distingue la souche française de la souche belge est que la première ne sécrète pas le poison soluble convulsivant et non antigénique de la seconde à un taux suffisant pour qu'il puisse être mis en évidence.

Hémolysine. — Dans les cultures de vingt-quatre heures à 33°, on peut mettre en évidence une hémolysine active au 1/20 de centimètre cube sur les globules rouges de mouton. Le pouvoir hémolytique augmente progressivement avec le temps et atteint le titre de 1/100 de centimètre cube vers le sixième jour. Cette hémolysine est neutralisée par les sérums anti-D, anti-A, anti-B et anti-*perfringens* au même taux de 1/500 de centimètre cube après un contact de trois heures à l'étuve. Cette hémolysine trouble le sérum humain frais et l'ovoléithine (réaction de Nagler). Cette action est inhibée par le sérum anti-*perfringens* et par le sérum antibotulique D. C'est donc une lécithinase immunologiquement parente du facteur α de *W. perfringens*. Fait inattendu et inexplicable, le pouvoir hémolytique de la toxine persiste en partie (au 1/20) après formolage à 8 p. 1.000 alors que le pouvoir toxique est disparu et l'ensemble transformé en anatoxine. Cette hémolysine est précipitée par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à saturation en même temps que la toxine ; une solution de toxine sèche dans l'eau physiologique à la dose de 1 mg. par centimètre cube est hémolytique.

Anatoxine. — La toxine brute de *Cl. botulinum* D, souche française est facile à atténuer par le formol, alors que la toxine brute obtenue de la souche belge n'était pas atténuée. Le taux de formol nécessaire est de 8 p. 1.000 et le temps minimum de détoxication de dix jours à 37°. A ce stade, le cobaye, animal très sensible, supporte 5 cm³ de ce produit sans le moindre symptôme. Nous espérons, avec cette anatoxine obtenir un sérum anti-D beaucoup plus actif que celui que nous avons obtenu avec la souche belge dont la toxine n'a jamais donné une DMm inférieure à 1/2.000 de centimètre cube.

CONCLUSIONS. — Dans une enzootie de botulisme équin survenue récemment dans l'Aisne, la première souche française de *Cl. botulinum* D a été isolée. Sa toxine tue la souris au 1/100.000 de centimètre cube. La différence essentielle avec la souche belge est l'absence de poison soluble convulsivant non antigénique. Cette toxine est entièrement neutralisée par le sérum anti-D préparé antérieurement avec la souche belge et non neutralisée par les sérums anti-A et anti-B. Elle peut être extraite des corps microbiens par la méthode de Raynaud. Après concentration et purification de celle-ci par congélation fractionnée, la DMm atteint 1/1.000.000 de centimètre cube.

Cl. botulinum D sécrète une hémolysine faible qui est une lécithinase du même type antigénique que la lécithinase α de *W. perfringens*. La toxine brute se transforme aisément en anatoxine par formolage à 8 p. 1.000 après dix jours d'incubation à 37°.

(Institut Pasteur, Service des Anaérobies.)

QUELQUES ESSAIS DE TRANSMISSION DE LA TOXOPLASMOSE PAR ARTHROPODES PIQUEURS

par GEORGES BLANC, JEAN BRUNEAU et ALAIN CHABAUD.

En 1917, Chatton et Blanc écrivaient à propos des toxoplasmes et de la toxoplasmose : « Son mode de transmission est inconnu. Il paraît devoir comporter, comme pour les hémogrégarines, hémospories et trypanosomides, l'intervention d'un arthropode vecteur où se déroulerait l'évolution sexuée du parasite, non encore entrevue et seul critérium de sa place précise dans la systématique » (1). Lorsqu'ils écrivaient ces lignes, qui gardent actuellement leur valeur, ces auteurs étaient tentés de classer les toxoplasmes parmi les sporozoaires et comparaient la schizogonie qu'ils avaient observée à celle des coccidies ; ils soulignaient cependant le fait que la multiplication par scission binaire (tomogonie) est absolument exceptionnelle chez les sporozoaires. Depuis cette époque la plupart des auteurs considèrent que les formes de schizogonie observées par Chatton et Blanc ne seraient que des pseudo-schizogonies.

Quoi qu'il en soit, s'il s'agit d'un sporozoaire, la forme sexuée doit se trouver chez un arthropode.

A côté de ce problème de systématique se pose un autre problème, celui du mode de transmission de la toxoplasmose.

Certains faits paraissent prouver que la transmission de l'infection est dans certains cas facile, tels ceux que Chatton et Blanc ont observés en Tunisie. Ces auteurs notent que la toxoplasmose du Gondi *Ctenodactylus gundi* (Pallas) n'a été constatée que sur les animaux ayant au moins dix-sept jours de captivité à l'Institut Pasteur de Tunis. Leurs recherches portant sur 400 gondis libres sont restées infructueuses. Il semble bien que c'est dans les locaux de l'Institut Pasteur que les gondis se sont infectés. Cette supposition se trouve renforcée du fait que 2 chiens du chenil du même établissement ont été trouvés infectés de toxoplasmose, l'un par Yakimoff (2), l'autre par Blanc (3). Celui observé par Blanc avait été inoculé avec des rhipicéphales provenant d'un autre chien. Ces faits et la présence de *Rhipicephalus sanguineus* sur le gondi avaient conduit Chatton et Blanc à suspecter le rôle de cette tique dans la transmission de la toxoplasmose en Tunisie (4).

La transmission de la toxoplasmose doit se faire nécessairement soit indirectement, par l'intermédiaire d'un arthropode, soit directement par contamination des muqueuses par un parasite libre. Dans la pre-

(1) E. CHATTON et G. BLANC, *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1917, 10, 2.

(2) W. L. YAKIMOFF et N. KOHL-YAKIMOFF, *Bull. Soc. Path. exot.*, 1911, 4, 617.

(3) G. BLANC, *Bull. Soc. Path. exot.*, 1917, 10, 377.

(4) E. CHATTON et G. BLANC, *loc. cit.*, 14.

mière hypothèse, il faut supposer, étant donné le grand nombre d'espèces de vertébrés trouvés naturellement infectés, que le parasite, qui manifeste si peu de spécificité pour les vertébrés, ou bien n'en a pas davantage pour les arthropodes hématophages ou autres, ou bien évolue chez un arthropode à large extension et pouvant piquer des hôtes bien différents. Dans la seconde hypothèse nous devons tenir compte d'un fait : l'extrême fragilité du toxoplasme après la mort de l'animal infecté, et le délai très court de sa survie, ce qui exclut la possibilité d'une conservation dans les cadavres. Il faut donc supposer, si les arthropodes ne jouent aucun rôle, qu'il y a chez le toxoplasme une forme de résistance pouvant vivre et garder sa virulence en dehors de l'organisme du vertébré.

Nous avons commencé à aborder ces problèmes par quelques expériences faites avec divers arthropodes piqueurs : puces (*Xenopsylla cheopis*), diptères (*Stomoxys calcitrans* et *Aedes aegypti*), tiques (*Rhipicephalus sanguineus*).

EXPÉRIENCES AVEC LES PUCES.

EXPÉRIENCE I. — Dans une cuve plusieurs milliers de *X. cheopis* d'élevage piquent successivement, en seize jours, 7 mérions infectés (5). Moins de vingt-quatre heures après le dernier repas infectant 50 puces sont inoculées à un *Xerus*, qui meurt infecté douze jours plus tard. 2 mérions infectés sont encore mis successivement dans la cuve. Pendant quatre jours les puces sont laissées à jeun, puis une centaine sont inoculées à un *Xerus* qui ne s'infecte pas. Le même jour, un cobaye neuf est introduit dans la cuve où il restera pendant un mois sans s'infecter.

EXPÉRIENCE II. — 500 puces retirées de la cuve sont mises, dès la fin du dernier repas infectant, en tube Borrel fermé par une soie à bluter et nourries pendant trois jours sur un mérion neuf qui ne s'infecte pas. Elles sont alors nourries successivement sur 5 mérions infectés, puis sur 2 mérions neufs. Ces 2 derniers restent indemnes.

EXPÉRIENCE III. — 500 puces sont retirées de la cuve, six jours après leur dernier repas infectant, mises dans un tube Borrel fermé par une soie à bluter, elles sont alors nourries pendant douze jours sur un cobaye neuf qui ne s'infecte pas. Deux expériences d'inoculation avec les puces de ce tube sont négatives, l'une faite avec un lot de 50 puces, quatorze jours après le dernier repas infectant, l'autre avec un lot de 30 puces, seize jours après le dernier repas infectant, chaque lot est inoculé à une souris par voie intrapéritonéale, aucune ne s'infecte. Les puces survivantes du tube Borrel sont alors mises à piquer pendant

(5) Pour nos expériences d'infection des arthropodes nous avons utilisé, le plus souvent, deux espèces de rongeurs non rares au Maroc : le mérion (*Meriones shawi*) [Duvvernoy] de la famille des *Cricetidae* et l'écureuil de Gétulie *Xerus (allantoxerus) getulus* [Linné] de la famille des *Sciuridae*, tous deux extrêmement sensibles à la toxoplasmose et faisant une infection expérimentale intense avec présence d'innombrables parasites dans les tissus et le liquide d'ascite. Le sang est toujours virulent.

trois jours sur un mériion infecté. Après le dernier repas infectant 10 puces sont inoculées à une souris, qui meurt de toxoplasmose dix jours plus tard. La même expérience est faite successivement avec des puces inoculées à des souris vingt-quatre heures, deux, trois et cinq jours après le repas infectant. Les souris ne s'infectent pas.

En résumé, les puces *Xenopsylla cheopis* s'infectent facilement sur des rongeurs en pleine évolution de toxoplasmose, ce que prouve leur inoculation à des rongeurs sensibles à l'infection, mais cette infection de la puce ne persiste que quelques heures ; plusieurs jours et même un jour après le repas infectant, elles n'ont plus de virus. A aucune période, elles n'ont transmis l'infection par piqûre.

EXPÉRIENCES AVEC LES STOMOXES (*Stomoxys calcitrans*).

EXPÉRIENCE I. — Des stomoxes, pris dans une écurie et laissés vingt-quatre heures à jeun, sont mis à piquer un *Xerus* infecté. Le même jour, 2 d'entre eux sont inoculés, par voie péritonéale, à une souris qui meurt de toxoplasmose neuf jours plus tard. Quarante-huit heures plus tard, 2 stomoxes de la même série sont inoculés à une souris qui ne s'infecte pas.

EXPÉRIENCE II. — 10 stomoxes piquent un *Xerus* infecté ; vingt-quatre heures plus tard, ils sont nourris sur un cobaye neuf qui ne s'infecte pas.

EXPÉRIENCE III. — 34 stomoxes piquent pendant trois jours un cobaye infecté. Après vingt-quatre heures, sans repas sanguin, ils piquent pendant six jours un cobaye neuf qui ne s'infecte pas.

En résumé, les stomoxes qui piquent un rongeur infecté s'infectent eux-mêmes, mais ne peuvent transmettre la toxoplasmose par piqûre, les parasites disparaissent en quelques heures de leur organisme.

EXPÉRIENCES AVEC LES STEGOMYIAS (*Aedes aegypti*).

EXPÉRIENCE I. — 60 stegomyias sont nourris pendant deux jours sur un *Xerus* infecté ; le lendemain, 5 d'entre eux sont inoculés à une souris qui meurt neuf jours plus tard de toxoplasmose. Deux jours après le repas infectant, un cobaye neuf est introduit dans la cage et piqué pendant deux jours, il ne s'infecte pas.

EXPÉRIENCE II. — 60 stegomyias gorgés sur un mériion infecté sont mis à piquer pendant la nuit un mériion neuf qui ne s'infecte pas. Le lendemain, 10 stegomyias sont broyés et inoculés par voie péritonéale à une souris qui ne s'infecte pas.

En résumé, comme dans les expériences précédentes, infection du moustique par piqûre de rongeur infecté, infection fugace qui disparaît dans les vingt-quatre heures, non transmission de la toxoplasmose par piqûre.

EXPÉRIENCES AVEC LES TIQUES (*Rhipicephalus sanguineus*).

EXPÉRIENCE I. — De nombreuses larves de rhipicéphales sont mises à piquer sur un *Xerus* infecté. Après trois jours, des larves gorgées sont recueillies et 30 sont inoculées à un *Xerus* qui meurt douze jours

plus tard de toxoplasmose. Après cinq jours, les dernières larves gorgées sont récoltées et quelques heures après leur dernier repas 30 sont inoculées à une souris qui meurt de toxoplasmose douze jours plus tard.

Les larves de rhipicéphales se sont donc bien infectées sur le *Xerus*. Après la mue, les nymphes nouvelles écloses sont mises à piquer un *Xerus* neuf qui ne s'infecte pas, cependant que 100 nymphes du même lot sont inoculées à un autre *Xerus* qui ne s'infecte pas. Il s'est écoulé douze jours depuis le dernier repas infectant. Six jours plus tard, 25 nymphes sont inoculées à une souris, sans résultat.

EXPÉRIENCE II. — Des larves de rhipicéphales sont gorgées sur un mériion infecté ; après la mue, les nymphes sont mises à piquer sur un autre mériion infecté et, quatre jours après qu'elles ont été recueillies, 5 d'entre elles sont inoculées à un mériion neuf qui ne s'infecte pas.

EXPÉRIENCE III. — Des larves de rhipicéphales piquent un *Xerus* infecté ; après la mue, les nymphes sont nourries sur un autre *Xerus* infecté ; 15 d'entre elles, récoltées, gorgées, sont inoculées, moins de douze heures après, à une souris qui meurt de toxoplasmose. Sept jours plus tard, 15 autres, inoculées huit jours après le repas infectant, à une autre souris, ne l'infectent pas.

En résumé, les rhipicéphales, à l'état de larves ou de nymphes, s'infectent en se gorgeant sur le rongeur infecté. L'infection est de courte durée, elle ne persiste ni après la mue ni même dans les quelques jours qui suivent le repas infectant.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

D'expériences trop peu nombreuses pour permettre une conclusion définitive, il ressort cependant que divers arthropodes hématophages, nourris sur des animaux infectés de toxoplasmose, peuvent ingérer le parasite qui se retrouve dans leur organisme ainsi que le démontrent les expériences d'inoculation. Cependant cette infection paraît être de très courte durée, ne dépassant pas quelques heures après l'ingestion de toxoplasmes. Dans aucun cas, ces arthropodes n'ont pu transmettre l'infection par piqûre (6).

Si ces données étaient confirmées par d'autres expériences, il serait difficile de rattacher les toxoplasmes à la classe des sporozoaires, sans que leur position systématique soit, de ce fait, déterminée. Il faudrait aussi admettre qu'il doit y avoir un mode de transmission direct de l'infection rendu possible par l'existence de formes de résistance capables de vivre en dehors du vertébré.

(Institut Pasteur du Maroc.)

(6) Tous les animaux ayant résisté aux inoculations ou piqûres ont été éprouvés avec le virus de passage et ont normalement réagi.

MISE EN ÉVIDENCE DE L'ALLERGIE LATENTE CHEZ LE COBAYE

par J. VALTIS et F. VAN DEINSE.

Willis, le premier, en 1928, a montré que le cobaye, inoculé une première fois avec des bacilles de Koch atténués, peut perdre spontanément la sensibilité vis-à-vis de la tuberculine et qu'une nouvelle inoculation de bacilles de Koch virulents chez le même animal provoque la réapparition de l'allergie tuberculinique dans un délai beaucoup plus court qu'après la première inoculation (1).

D'autre part, au I^{er} Congrès International du BCG, à Paris, en 1948, certains auteurs, notamment Ustvedt, de Norvège, ont attiré l'attention sur le fait que, chez les enfants vaccinés au BCG, et dont l'allergie vis-à-vis de la tuberculine a spontanément disparu, l'inoculation, dans le derme, de bacilles de Koch morts ou de BCG mort, détermine en quelques jours une réaction dermique, qui, d'après ces auteurs, est le signe de l'existence d'une allergie latente, non décelable par la tuberculine. C'est ce que Ustvedt appelle le « diagnostic-test ».

On sait, comme l'ont d'ailleurs vu A. Boquet et J. Breley, que les cobayes, inoculés avec du BCG même à haute dose, peuvent, après un certain temps, cesser de réagir positivement à l'épreuve dermique à la tuberculine.

Nous avons voulu voir si des animaux de cette catégorie ne présentaient pas une allergie latente susceptible d'être mise en évidence, soit par le phénomène de Willis, soit par le « diagnostic-test ».

A cet effet, dans une première série d'expériences, nous avons choisi 3 cobayes, dont 2 avaient été inoculés le 12 août 1948, avec 10 mg. de BCG par voie sous-cutanée, et le troisième le 18 novembre 1948, avec la même dose, par la même voie. A la suite de ces inoculations, ces animaux ont réagi positivement à la tuberculine par voie intradermique (0,1 cm³ de la solution au 1/10). Ces mêmes animaux, éprouvés de la même façon le 7 septembre 1949, furent trouvés négatifs à la tuberculine. Le 29 septembre 1949, ces 3 cobayes, en même temps que 3 cobayes neufs, reçurent, par voie sous-cutanée, une injection de 0,1 mg. de bacilles de Koch virulents (souche bovine Dupré). Le 3 octobre, quatre jours après l'inoculation virulente, les cobayes furent éprouvés par la tuberculine (0,1 cm³ d'une solution au 1/10 par voie intradermique). Les 3 cobayes préalablement inoculés avec du BCG et qui avaient cessé de réagir à la tuberculine, ont réagi nécrotiquement à cette dernière épreuve, alors que, chez les 3 cobayes témoins, la réaction fut négative. Ce n'est que le 13 octobre, quinze jours après l'inoculation virulente, comme d'habitude, que ces derniers animaux ont réagi à leur tour, positivement à la tuberculine. Ainsi, dans cette première série d'expériences, nous avons pu confirmer les expériences de Saenz et Canetti (2) montrant l'existence, chez le cobaye, du phénomène de Willis.

(1) WILLIS. *Am. Rev. Tuberc.*, 1928, **18**, 240.

(2) SAENZ et CANETTI, *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **133**, 352.

Dans une seconde série d'expériences, nous avons choisi 10 cobayes, qui avaient été inoculés chacun avec 10 mg. de BCG par voie sous-cutanée, et qui avaient réagi positivement à la tuberculine à la suite de ces inoculations. Ces cobayes, éprouvés de nouveau comme la première fois avec 0,1 cm³ de tuberculine au 1/10 dans le derme, furent trouvés négatifs le 7 septembre 1949, soit respectivement quatre, cinq, sept, huit, quatorze mois après l'inoculation du BCG. Parmi ces cobayes, 3 furent inoculés le 29 novembre 1949 par voie intradermique avec 0,05 mg. de BCG tué par chauffage et 7 par la même voie avec 3,5 mg. de BCG mort. Ces 10 cobayes ont tous présenté, vingt-quatre heures après, une réaction dermique sous forme d'œdème et rougeur, devenue beaucoup plus intense quarante-huit heures après l'inoculation intradermique du BCG mort, et même nécrotique chez quelques cobayes ayant reçu la dose de 3,5 mg. Ainsi, la réinjection de BCG mort chez des cobayes, inoculés quelques mois auparavant avec du BCG vivant et qui ont cessé de réagir à la tuberculine, est suivie d'une réaction rapide analogue à celle que provoque la tuberculine et apparaissant dans les mêmes délais.

Nous inspirant des recherches faites chez l'homme par Arlindo de Assis, Sayé et Rosenberg (3), nous avons voulu savoir si cette inoculation de BCG mort dans le derme, chez ces mêmes cobayes, a pour conséquence une réapparition rapide de la sensibilité à la tuberculine.

Nous avons donc éprouvé ces cobayes par l'injection intradermique de 0,1 cm³ de tuberculine au 1/10, quatre jours après l'inoculation de BCG mort.

Les 3 cobayes qui avaient été inoculés avec 0,05 mg. de BCG mort ont tous les 3 réagi nettement à la tuberculine, dont 2 d'entre eux fortement.

Par contre, sur les 7 cobayes inoculés avec 3,5 mg. de BCG mort, 1 a réagi fortement, 3 nettement et 3, dont 1 en mauvais état, ont présenté une réaction nulle.

Il ressort de ces expériences qu'il existe, chez le cobaye préalablement inoculé avec du BCG et redevenu négatif à la tuberculine, une allergie latente et atténuée, qu'on peut mettre en évidence, soit par le phénomène de Willis (réapparition de l'allergie tuberculinique après surinfection par bacilles de Koch virulents), soit par une inoculation intradermique de BCG mort, analogue au test diagnostic de Ustvedt. Enfin, cette inoculation de BCG mort est suivie, chez la plupart des cobayes, d'un retour rapide (quatre jours) de l'allergie tuberculinique. Des phénomènes de ce genre ont été décrits en clinique humaine par de Assis et par Sayé.

Les faits que nous venons de décrire montrent que, du moins chez le cobaye inoculé avec du BCG, la perte de la sensibilité vis-à-vis de la tuberculine ne signifie pas disparition de toute allergie : il reste un degré d'allergie non décelable par la tuberculine, mais qu'on peut mettre en évidence, soit par une surinfection virulente, soit par une inoculation intradermique de BCG mort.

(Institut Pasteur. Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose.)

(3) L. SAYÉ. 1^{er} Congrès International du BCG, 18-23 juin 1948, 127.

**RÉACTION D'HÉMAGGLUTINATION,
TYPE DUBOS MIDDLEBROOK
RÉALISÉE AVEC UNE TUBERCULINE PURIFIÉE
RÉSULTATS OBTENUS**

par R. SOHIER

[avec la collaboration de J. JUILLARD et I. TRIMBERGER] (*).

R. Dubos et G. Middlebrook (1), en montrant que le sérum des sujets présentant une infection tuberculeuse en évolution avait le pouvoir d'agglutiner les hématies de mouton sur lesquelles était fixé un extrait de bacilles tuberculeux, ont apporté une technique nouvelle d'étude des modifications humorales au cours de la tuberculose.

S'ajoutant à celles déjà connues et qui ne fournissent pas toutes les précisions qu'on pouvait attendre du diagnostic sérologique de la tuberculose, elle méritait d'être étudiée, d'autant que les premiers résultats obtenus aux Etats-Unis par les auteurs qui l'ont décrite et les renseignements que nous avons pu obtenir de ceux qui l'ont mise en œuvre (2) semblent des plus satisfaisants. D'ailleurs tout récemment Gernez-Rieux et A. Tacquet (3), tenant compte des constatations qu'ils avaient faites après étude de 138 sérums, ont attiré l'attention sur la spécificité et la sensibilité de cette réaction.

Mais, si la technique générale en est simple, il faut reconnaître que la préparation de l'antigène destiné à « sensibiliser » (4) spécifiquement les hématies est compliquée. En outre, il semble qu'il soit difficile d'obtenir un produit ayant toujours les mêmes propriétés. Sachant que pour la sensibilisation des hématies quelques auteurs avaient tout simplement employé la tuberculine (5), nous avons, après divers essais qui ne peuvent être rapportés dans cette courte note, fixé notre choix sur la tuberculine dite purifiée ou précipitée de l'Institut Pasteur (6).

(*) Travail effectué avec l'aide de la Caisse nationale de la Sécurité sociale.

(1) R.-J. DUBOS et G. MIDDLEBROOK, *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 521.

(2) Nous remercions beaucoup le Dr R. Dubos de l'Institut Rockefeller, le Dr Mac Dermott et son collaborateur le Dr Robson du New-York Hospital Cornell University, pour l'amabilité avec laquelle ils nous ont fait part des résultats de leurs recherches. Nos remerciements vont aussi aux bactériologistes de la Division of Laboratories and Research (Department of Health State of New-York) pour leur accueil et les utiles indications qu'ils nous ont données à Albany (N. Y.).

(3) C. GERNEZ-RIEUX et A. TACQUET, *Bull. Acad. Med.*, 1949, 556.

(4) Nous adopterons ce terme, encore qu'il puisse prêter à discussion, car il figure dans le travail initial de R. DUBOS et G. MIDDLEBROOK.

(5) Voir note (2).

(6) Il s'agit du produit de l'Institut Pasteur livré sous le nom de tuberculine purifiée, puis tuberculine précipitée pour intradermo-réaction, solution mère au 1/100 dont 1 cm³ = 10 milligrammes de tuberculine précipitée.

La technique utilisée a été celle proposée par R. Dubos et G. Middlebrook, avec quelques légères modifications relatives aux volumes utilisés. sensibilisation des hématies 0,15 cm³ de globules rouges de mouton recueillis depuis au moins quarante-huit heures (7) en contact avec 2,5 cm³ de tuberculine : deux heures à 37° au bain-marie. Après lavage, dilution à raison de 0,1 cm³ d'hématies sensibilisées dans 10 cm³ d'eau physiologique, volume des dilutions successives de sérum (après absorption des agglutinines naturelles anti-mouton), volume d'hématies sensibilisées 0,05 cm³.

Dilution de 1/2 à 1/256, en réalité après addition des hématies, 1/2,3 à 1/294,4.

Lecture après deux heures au bain-marie à 37° et après vingt-deux heures de séjour à 10-12°. Nous ne tiendrons compte d'ailleurs dans ce qui va suivre que des résultats obtenus à la première lecture, les autres devant faire l'objet d'études et confrontations ultérieures.

Pour chaque série nous avons soin de faire des témoins avec des sérums de lapins vaccinés et des sérums humains de titre connu.

Nous résumerons brièvement les résultats obtenus à ce jour et portant au total sur 227 sérums examinés.

Pour plus de clarté, nous indiquerons les constatations faites chez les tuberculeux, chez les sujets atteints d'affections présumées non tuberculeuses, chez les sujets adultes sains dont le comportement vis-à-vis des épreuves à la tuberculine et au BCG était connu.

Nous admettons, compte tenu des renseignements que nous avons recueillis aux Etats-Unis (Institut Rockefeller, New-York Hospital, Laboratoire de l'Etat de New-York, à Albany), que la positivité est comptée à partir des taux de 1/8 (dans notre méthode 1/9,2).

I. MALADES. SUJETS ADULTES. — Tuberculose pulmonaire évolutive 17 cas, 8 réactions positives et 9 négatives, mais il convient de noter dès maintenant que 8 sur 9 de ces hémagglutinations négatives correspondent à des malades atteints de formes très graves ulcéro-caséuses excavées, pour la plupart arrivées à la période terminale.

Pleurésies sérofibrineuses : 3 réactions positives.

Affections broncho-pulmonaires non tuberculeuses 10 cas ; réactions positives 0.

Enfants. — Méningite tuberculeuse 4 cas ; réactions fortement positives (1/36 à 1/73) 4.

Primo-infection tuberculeuse 3 cas : réactions positives 2, négative 1.

Tuberculose miliaire 3 cas : réactions positives 3.

Pneumopathie de nature indéterminée 1 : réaction positive faible 1.

Affections diverses non tuberculeuses 5 : réactions négatives 5.

II. SUJETS SAINS. JEUNES ADULTES dont avait pu être précisé le *mode de réaction à la tuberculine* (épreuve à l'aiguille type Trambusti et intradermo-réaction au milligramme) et au *vaccin BCG tué* (scarification à l'aiguille pleine à travers 1 goutte de vaccin BCG de l'Institut Pasteur tué par chauffage à 100° en une heure).

130 cas : réactions négatives, 121 ; réactions positives, 19, dont 9 à 1/9, 8 à 1/18 et 2 à 1/36. Parmi ces réactions positives on compte 12 sujets ayant des réactions tuberculiniques positives et 16 réagissant à l'épreuve au vaccin BCG.

Comparativement on notait pour les 121 réactions d'hémagglutination négatives : réactions tuberculiniques : 74 positives, 47 négatives.

(7) Nous avons constaté, en effet, que les hématies, récemment prélevées, ne convenaient pas pour la réalisation du phénomène d'hémagglutination. Dubos et Middlebrook se servaient d'ailleurs d'hématies conservées en solution d'Alsever.

Sujets vaccinés. — Nous avons en outre effectué pour 11 sujets la réaction d'hémagglutination avant et après vaccination au BCG. Les taux constatés sont demeurés inchangés dans 9 cas, alors qu'on notait une légère augmentation pour 2 d'entre eux. D'autres contrôles sont nécessaires.

Lapins. — Il était utile et intéressant de pratiquer la réaction d'hémagglutination avec le sérum de lapins auxquels avait été inoculé par diverses voies du vaccin BCG ou une culture de la souche homogène Arloing et Courmont. C'est d'ailleurs avec du sérum de lapin inoculé avec le BCG que Dubos et Middlebrook avaient mis au point leur technique.

Les résultats obtenus se résument comme suit : tous les lapins vaccinés au BCG, que ce soit par voie intraveineuse ou par scarification, ont produit les anticorps hémagglutinants à des taux allant de 1/18 à 1/294,4. En opposition, 7 lapins neufs ont fourni des sérums donnant des réactions négatives (dont 6 à 0 et une à 1/4).

Les deux lapins ayant reçu une suspension de culture de la souche homogène Arloing et Courmont ont fourni des anticorps aux taux respectifs de 1/36,8 et 1/73,2.

En terminant, rappelons que les hématies de cobaye nous ont donné des résultats beaucoup moins satisfaisants que les hématies de mouton.

Notons enfin qu'il était tentant de simplifier la méthode en employant non plus les hématies de mouton (qui exigent une absorption préalable des agglutinines naturelles du sérum humain), mais les hématies humaines du groupe O. Les résultats obtenus avec 6 sérums de lapins (ceux-ci absorbés au préalable) et 12 sérums humains, nous ont fourni des résultats en concordance avec ceux obtenus en utilisant les hématies de mouton.

Mais les recherches effectuées sur des hématies O de diverses provenances nous incitent à poursuivre des recherches de contrôle avant d'établir si cette méthode pourra être utilisée.

EN RÉSUMÉ. — La réaction dite d'hémagglutination type Dubos-Middlebrook, effectuée avec 227 sérums en employant la tuberculine dite précipitée de l'Institut Pasteur de Paris nous a donné des résultats dans l'ensemble satisfaisants. Elle n'est apparue négative chez des adultes tuberculeux authentiques que dans des formes graves. Les réactions les plus constamment et fortement positives ont été constatées pour les sérums d'enfants récemment infectés.

Pour un petit nombre de sujets apparemment en bonne santé, la réaction a été trouvée positive et il conviendra d'en rechercher les raisons. Les premiers résultats obtenus en employant les hématies humaines du groupe O permettent d'envisager une simplification de la méthode.

(Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon.)

INTRADERMO-RÉACTION TUBERCULINIQUE A L'AIGUILLE RÉSULTATS OBTENUS AVEC UN INSTRUMENT A PÉNÉTRATION AUTOMATIQUE RÉGLABLE

par R. SOHIER (*).

L'importance qu'ont prise les épreuves à la tuberculine, aussi bien en pratique médicale courante, pour le diagnostic des diverses formes de l'infection tuberculeuse, qu'en prophylaxie, pour le choix des sujets qui doivent bénéficier de la vaccination par le BCG, justifie les recherches sans cesse poursuivies pour le perfectionnement des méthodes permettant leur mise en œuvre.

L'idéal à atteindre paraît résider dans les techniques présentant les avantages essentiels suivants : simplicité, rapidité, sensibilité, spécificité, innocuité.

Or, il est peu de méthodes, parmi celles actuellement employées, qui réunissent toutes les qualités. Lorsqu'elles sont simples (cuti-réaction) elles ne peuvent être faites rapidement et sont trop peu sensibles. Lorsqu'elles sont simples et rapides (tuberculine sous emplâtre ou « patch-test »), elles sont souvent insuffisamment sensibles, du moins chez l'adulte. Quand elles réunissent les qualités de sensibilité et spécificité (intradermo-réaction au milligramme) elles ne sont ni rapides ni toujours inoffensives, étant entendu qu'on se limite d'emblée à une seule épreuve.

Récemment, Savonen (1) a attiré l'attention sur une méthode intéressante proposée par Trambusti (2) et légèrement modifiée. Elle consiste en une piqûre faite à travers 1 goutte de tuberculine brute avec une aiguille n° 12. Cette méthode aurait donné des résultats semblables à ceux obtenus avec l'I. D. (3) faite à la seringue avec 1/10 de centimètre cube de tuberculine au 1/100 et ce, sans incidents notables. Il s'agit là d'ailleurs, ainsi que nous l'avait fait remarquer très justement J. Bretey, d'une méthode très voisine de celle qu'utilisait von Pirquet lors de ses premières recherches sur la cuti-réaction tuberculinique. L'appareil qu'il employait était très voisin d'une aiguille.

Dans un rapport présenté le 16 novembre 1948, au Comité Consultatif du Service de Santé de l'Armée (4), nous avons cru devoir attirer l'attention sur l'intérêt de cette technique et avons commencé immédiatement les recherches. Charpin (5) a rapporté en 1949 les résultats

(*) Travail effectué avec l'aide de la Caisse nationale de la Sécurité sociale.

(1) *Recueil des Travaux du 1^{er} Congrès International du BCG, Institut Pasteur*, juin 1948, 314.

(2) Voir référence (1).

(3) Lire désormais pour I. D. : intradermo-réaction.

(4) Rapport sur la vaccination au BCG dans l'armée, Comité consultatif du 16 novembre 1948.

(5) CHARPIN, *Presse Médicale*, 1949, n° 49, 712.

satisfaisants obtenus avec ce qu'il appelle l'intradermo-réaction finlandaise.

Nous rapporterons dans cette note les constatations que nous avons pu faire chez 277 sujets et indiquerons une modification que nous croyons être un perfectionnement de la technique.

Rappelons tout d'abord que les essais réalisés par piqûre avec une aiguille creuse 12/10 (voisin du calibre indiqué par Trambusti) à travers 1 goutte de tuberculine brute (6) nous ont donné chez certains sujets très allergiques de violentes réactions dues, sans doute, à l'aspiration par le derme au moment du retrait de l'aiguille, d'une trop grande quantité de tuberculine. Par la suite, nos épreuves ont été faites avec des aiguilles de phonographe : très pointues, aisément stérilisables, faciles à tenir dans une pince à aiguille avec système de verrouillage, elles sont apparues d'emploi commode.

Comparée avec les autres épreuves et en particulier lorsqu'elles étaient négatives avec l'I. D. au 1/100 (1 mg.), cette méthode a donné les résultats suivants. Positivité en concordance avec les autres épreuves dans 43 cas sur 44. Négativité en concordance avec l'I. D. (faite à la seringue), à la dose de 1 mg. (0,1 à 1/100) dans 50 cas sur 54. Discordance dans 4 cas, soit : épreuve à l'aiguille négative I. D. au 1/100 positive chez 2 sujets. Epreuve à l'aiguille douteuse I. D. au 1/100, négative dans 2 cas.

Les avantages nets de l'épreuve à l'aiguille sont sa rapidité, sa simplicité et sa sensibilité, sans que celle-ci soit telle qu'elle entraîne chez les sujets très allergiques une réaction intense et diffuse. Elle se limite en effet, le plus souvent, en surface donnant une papule nettement perceptible à la palpation, sans l'inflammation diffuse constatée après l'I. D. faite à la seringue. Mais elle a l'inconvénient de provoquer, lorsqu'on la fait selon les indications de Trambusti (introduction de l'aiguille, puis torsion dans les deux sens sur son grand axe), une douleur parfois assez vive. En outre, elle exige une certaine habitude si l'on veut obtenir des résultats comparables, les réactions variant avec la profondeur à laquelle pénètre l'aiguille.

Nous avons donc cherché à mettre au point une méthode qui supprime les inconvénients précités et nous nous sommes arrêté actuellement à l'emploi d'une lancette type Bensaude (utilisée pour les prélèvements de sang par piqûre) modifiée pour la réalisation de l'épreuve tuberculinique.

Les modifications essentielles ont porté sur : le remplacement de la lancette par une aiguille en métal inoxydable du calibre des aiguilles de phonographe précédemment employées, mise en place d'une vis permettant de fixer la position du capuchon, de façon à régler la profondeur de pénétration de l'aiguille.

Nous ne doutons pas que cet appareil soit perfectible et nous nous employons à l'améliorer, mais nous avons cru pouvoir rapporter dès maintenant les résultats obtenus :

Chez 179 sujets, l'épreuve a donné : concordance avec la positivité des autres tests tuberculiniques (121 cas sur 121). Concordance avec la négativité de l'I. D. au 1/100 faite à la seringue dans 49 cas sur 58. Discordance

(6) Toutes nos recherches ont été faites avec la tuberculine brute de l'Institut Pasteur de Paris.

dans 9 cas sur 58. Soit : épreuve à l'aiguille à pénétration automatique négative, I. D. au 1/100 positive 1 cas. Discordance inverse 1 cas. I. D. au 1/100 positive et épreuve à l'aiguille douteuse : 1 cas ou douteuse puis secondairement positive, 4 cas. I. D. au 1/100 douteuse, épreuve à l'aiguille négative 1 cas. Discordance inverse 1 cas.

En outre, cette méthode est apparue très rapide (4 à 5 à la minute avec un aide) et surtout absolument indolore.

Elle n'a donné dans la majorité des cas qu'une réaction papuleuse superficielle et la diffusion des phénomènes inflammatoires n'a été observée que dans 3 cas chez des sujets très allergiques, mais sans aucun incident notable.

Notons qu'il est nécessaire (si l'on veut faire un témoin) d'avoir deux appareils : l'un qui réalise la piqûre témoin que nous avons cru utile d'effectuer pour nos recherches et qui permet d'éviter des erreurs dues à une réaction non spécifique du tégument lors du traumatisme, l'autre qui est utilisé pour la piqûre à travers la goutte de tuberculine brute.

L'asepsie est réalisée très rapidement et de façon, croyons-nous, suffisante, par trempage dans un petit tube à hémolyse contenant de l'éther et essuyage rapide.

EN RÉSUMÉ. — La méthode inspirée des recherches initiales de von Pirquet et préconisée par Trambusti pour la recherche de la sensibilité à la tuberculine et consistant à piquer la peau à travers 1 goutte de tuberculine brute apparaît très satisfaisante. Il y a intérêt à la réaliser avec une aiguille pleine. La mise en œuvre de cette technique peut être facilitée par l'emploi d'une aiguille à pénétration automatique réglable (inspirée de la lancette type Bensaude), qui a l'avantage de donner une grande rapidité et une grande précision en supprimant pratiquement toute douleur et en évitant les réactions importantes chez les sujets très sensibles à la tuberculine.

(Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon.)

SUR UNE SOUCHE ATYPIQUE DE BACILLE PESTEUX

par V. REYNES.

Chez un malade européen contaminé au Laos et qui présentait des accidents nerveux très importants, une suppuration ganglionnaire secondaire au stade septicémique, des accidents oculaires et une hépatite congestive (1), fut isolé, du sang et du pus ganglionnaire, un germe présentant les caractères suivants : bacilles courts, immobiles, Gram-négatifs, isolés ou en amas.

Les premiers repiquages n'ont donné de résultats qu'en milieux au

(1) Voir l'observation clinique dans un numéro ultérieur de *Médecine tropicale*.

sang ou à l'extrait globulaire, à l'exclusion des milieux usuels, même additionnés d'ascite (incubation à 27° et à 37°). Le germe s'est adapté lentement aux milieux usuels liquides ; il a fallu près de deux mois pour obtenir des colonies sur gélose nutritive (pH 7,5 ou 6,8).

Un lapin inoculé dès l'isolement du germe présenta, à la soixante-dixième heure, une impotence fonctionnelle de la patte antérieure gauche, bientôt étendue à la patte postérieure du même côté. Mort au quatrième jour : culture du sang positive.

Les premiers éléments pour le diagnostic du germe étaient donc : bacille hémoglobophile, neurotrope chez le malade et le lapin.

Une fois adapté aux milieux usuels, les caractères du germe étaient les suivants : anaérobie facultatif, culture plus rapide à pH 7,5 qu'à 6,8, pousse aussi facilement à 37° qu'à 28°, en vingt-quatre heures.

Dans les milieux liquides, dès la vingt-quatrième heure, apparaît un trouble uniforme, puis, vers le dixième jour, un anneau gras en surface. La culture se produit en eau de levure et en présence de bile.

Sur milieux solides, fines colonies visibles en vingt-quatre heures, lisses, rondes, translucides, régulières, n'adhérant pas au milieu. Sur pomme de terre, culture aléatoire : quelques rares colonies sont obtenues sur pomme de terre naturelle ou alcaline : aucune sur pomme de terre glycinée. Action nulle sur lactose, saccharose ; en vingt-quatre heures, virage du tournesol avec glucose, maltose, mannite, sans gaz. Avec la glycérine et le rhamnose, pas de virage en milieu glucosé, mais ces deux sucres sont attaqués en eau peptonée. Pouvoir protéolytique nul ; gélatine non liquéfiée ; lait ni coagulé, ni acidifié. Nitrates réduits en nitrites. Ni indol, ni H_2S . Vitalité très grande (plus de quarante mois).

Pouvoir pathogène considérable : l'inoculation intramusculaire provoque une septicémie mortelle chez la souris, le cobaye, le lapin et la poule. Le pigeon s'est montré résistant. Les animaux ne peuvent être protégés par le sérum antipesteux.

Le sérum du malade agglutinait ce germe à 1/200 à la quatrième semaine de la maladie et ne montrait aucun pouvoir agglutinant pour les souches de bacille pesteux et pseudo-tuberculeux. Un sérum préparé sur lapin avec ce germe et qui l'agglutinait à 1/1.600 était sans action sur le B. de Yersin et sur les B. pseudo-tuberculeux.

L'étude de ce germe a été reprise cinq ans après à l'Institut Pasteur de Paris (Service du Dr Girard). La conservation avait été assurée sans repiquage, par suite des circonstances, de juillet 1943 à février 1947. A ce moment, le germe tue encore la souris en dix-huit heures (voie péritonéale) ; chez le rat, il ne provoque qu'une adénite volumineuse mais transitoire. Son action sur la glycérine et le rhamnose est nulle. Dans les cultures de bouillon V. F. glucosé, on décèle, parmi les produits de métabolisme, de l'ammoniaque (0,02), des amines, des aldéhydes, de l'A. M. C., de l'acétone, de l'acide acétique et de l'acide lactique. En culture anaérobie, dans le même milieu, le germe donne de l'acide formique en proportion égale à celle de l'acide acétique. Les indicateurs de rH ne sont pas modifiés. On ne décèle ni indol, ni scatol, ni H_2S , ni alcool, ni crésol, ni phénol (Lab. du Dr Prévôt).

Les cultures sont inhibées par les bactériophages pesteux et pseudo-tuberculeux, mais trois colonies secondaires, repiquables, sont apparues

sur gélose en présence de bactériophage pesteux. Le germe ne renferme pas d'antigène glucido-lipidique.

Les endotoxines obtenues par congélation et décongélation tuent la souris au 1/10 de centimètre cube, l'agglutination est positive au 1/1.000 avec un sérum antipesteux.

En résumé, le germe présente donc à ce moment les caractères essentiels du B. pesteux.

Le diagnostic précis de ce germe a donné lieu, par contre, au début à bien des hésitations, par suite de son caractère hémoglobino-phile, de ses caractères culturels atypiques et de son pouvoir pathogène (poule). Après avoir éliminé l'hypothèse d'une Pasteurelle, c'est entre le B. de Yersin et le B. de Malassez et Vignal qu'on hésitait. Le malade provenait d'une station d'altitude du bas Laos, situé à 40 kilomètres d'un foyer de peste en activité. Il nous a déclaré avoir dépecé à mains nues, dix jours auparavant, un chien sauvage (*Canis indicus* Hodgs). Faut-il chercher dans ce fait l'origine de cette septicémie et avons-nous affaire à un virus sylva-tique, d'abord atypique, et qui a présenté, à la suite de nombreuses cultures, les caractères du B. de Yersin ?

(Institut Pasteur.)

M. G. Girard : Le microbe caractérisé dans mon laboratoire et sur mes indications par V. Reynes, est bien une *Pasteurella pestis* authentique, dont un long délai de conservation en dehors de la glacière avait atténué la virulence tout en maintenant la toxicité, constatation à tous égards normale. Quant au processus qui a provoqué, entre 1943 et 1947, de telles modifications entre le germe au temps de son isolement et cette *Pasteurella pestis* des plus classiques, il laisse le champ ouvert à plusieurs hypothèses. Mais il paraîtra difficilement acceptable à quiconque a l'expérience de la peste et de son agent étiologique, que celui-ci ait pu posséder au départ le pouvoir de cultiver rapidement à 37°, de troubler le bouillon de façon homogène en vingt-quatre heures et d'être doué d'une haute virulence pour la poule, réfractaire comme tous les oiseaux à la peste naturelle ou expérimentale, même si le virus est administré par voie intraveineuse. La communication de notre collègue n'exclut pas, à mon point de vue, l'éventualité de deux germes associés avec disparition de celui qui retint dès l'abord l'attention, ce qui permit dans la suite à *Pasteurella pestis* de révéler sa présence. Le fait est courant dans l'association pneumocoque-B. de Yersin, et j'ai rappelé ici même (ces *Annales*, 1946, 72, 708), ce que fut la méprise de Kitasato.

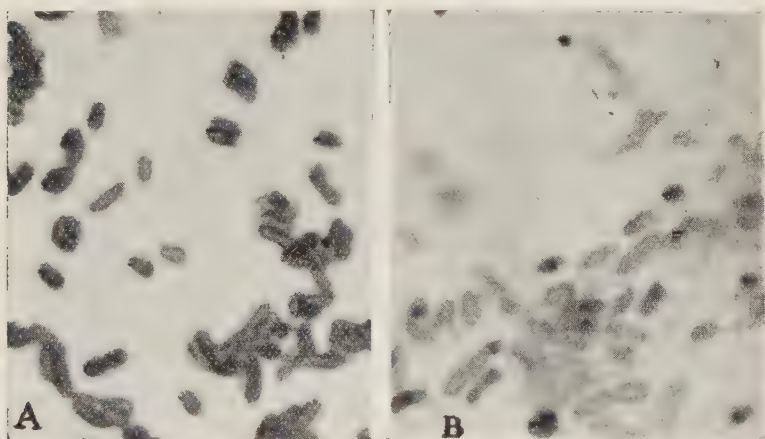
La lenteur de développement en culture de *Pasteurella pestis* contrastant avec sa longue vitalité ne peut que favoriser ce processus dans des cultures mixtes peste-germes pathogènes ou non pathogènes, si ces derniers, à l'encontre de *Pasteurella pestis*, croissent rapidement et n'ont qu'une durée de vitalité limitée.

**ÉTUDE CYTOLOGIQUE DE *P. PESTIS*
SOU MIS A L'INFLUENCE
DU BACTÉRIOPHAGE SPÉCIFIQUE**

**II. — ÉTUDE DE LA CELLULE PAR LA MÉTHODE DE ROBINOW
AU VIOLET CRISTAL**

par H. S. P'AN, Y. T. TCHAN et J. POCHON.

Dans une note précédente, nous avons montré que le bactériophage exerce une action sur l'appareil nucléaire de *P. pestis* (1). L'étude, au microscope électronique, de la fixation des bactériophages semble mon-



A, culture de *P. pestis* sans bactériophage. Coloration : violet-cristal. $\times 1\,200$.
B, culture de *P. pestis* contaminée par le bactériophage spécifique. Coloration : violet-cristal. $\times 1\,200$.

trer que eux-ci se fixent d'abord sur la membrane en utilisant leur queue comme appareil de pénétration. Les processus de multiplication intracellulaire des bactériophages restent inconnus (2).

En effet, nous avons déjà signalé (1) que l'attaque par le bactériophage, à un stade relativement avancé, entraîne un déchiquetage du contour de la cellule bactérienne. Ce phénomène correspond-il à une déchirure de la membrane ?

Des auteurs ont montré que les cellules attaquées ou lysées par le bactériophage présentent au microscope électronique des enveloppes vides plus ou moins déchirées et méconnaissables (2). Il nous a semblé intéressant de suivre l'évolution de la membrane, dans ces conditions, par une coloration appropriée.

(1) H. S. P'AN, Y. T. TCHAN et J. POCHON, ces *Annales*, 1949, **76**, 468.

(2) P. NICOLLE, *Biologie Méd.*, 1949, **38**, 233.

TECHNIQUE. — Nous avons utilisé, pour le prélèvement des cultures, la même technique que celle indiquée dans notre première note. Après dépôt de la culture sur lame et fixation par le fixateur de Bouin, on mordance par le tanin et colore au violet cristal, suivant la technique indiquée par Robinow (3).

RÉSULTATS. — Les observations faites sur les préparations témoins, c'est-à-dire, sans bactériophage, laissent voir la majorité des cellules normales avec une membrane cellulaire bien colorée. Si les cellules se présentent en chaînettes comme c'est souvent le cas pour *P. pestis*, on décèle très nettement des cloisonnements limitant chaque bactérie. Dans des cas exceptionnels, on trouve des cellules âgées possédant un ou deux petits granules centraux ou paracentraux.

Quand la culture est contaminée par le bactériophage spécifique, l'évolution est différente. D'abord, les cellules cessent de se diviser. Un ou deux grains apparaissent dans les cellules les plus atteintes. Puis, le nombre des cellules possédant des granulations s'accroît et certaines d'entre elles commencent à se modifier. La membrane perd de sa netteté et disparaît. Finalement, on ne voit que ces granules libres avec des débris cellulaires presque amorphes et méconnaissables.

DISCUSSION. — Ces granules doivent être à l'intérieur de la cellule bactérienne. En effet, s'ils étaient extérieurs, leur orientation permettrait de les voir sous forme de verrues accolées à la membrane microbienne ; or, ceci n'a pu être observé dans nos préparations.

D'autre part, le phénomène que nous venons de décrire possède une certaine spécificité. Des essais en présence d'antibiotiques (streptomycine, pénicilline) ne l'ont pas reproduit.

On peut seulement y trouver une certaine analogie avec les corpuscules bleus observés au microscope à fond noir par divers auteurs (D'Hérelle et coll., E. Wollman, P. Jeantet, K. B. Eisenberg et Merling, J. Bronfenbrenner, A. Pijper). Ces corpuscules bleus ont été interprétés comme étant des corpuscules bactériophagiques. Les granulations que nous avons signalées ne semblent pas constituées d'acide désoxyribonucléique comme le bactériophage ; à tout le moins, elles étaient hydrolysables par la ribonucléase ; et surtout, on peut les observer, très rarement, il est vrai, dans des cultures non contaminées par les bactériophages.

Nos recherches permettent de formuler une hypothèse toute provisoire : les granulations colorables par la méthode de Robinow, au violet cristal, chez *P. pestis*, sont des constituants anormaux. Leur formation serait accélérée par le bactériophage.

(Institut Pasteur. Service de Microbie technique.)

(3) ROBINOW, in DUBOS, *The Bacterial Cell*, 1946.

RECHERCHES SUR LES BENZOATASES DES AZOTOBACTER

II. — INFLUENCE DE L'ACIDE BENZOIQUE SUR LA CROISSANCE ET L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

par T. L. WANG.

Il a été expérimentalement montré que les *Azotobacter* utilisent l'acide benzoïque avec formation d'une substance noire analogue à l'humus (1). On sait, par ailleurs, que cet acide est présent dans le sol (2). Cependant, l'expérimentation au laboratoire ayant toujours été réalisée avec des doses de benzoate arbitrairement choisies et l'influence de la concentration n'ayant pas été étudiée, aucun fait précis ne permettait de conclure des résultats obtenus à la réelle efficacité du phénomène en géobiologie. Nous avons donc analysé l'influence de la concentration en benzoate sur la croissance et sur la formation de la substance noire.

TECHNIQUE. — Milieu minéral (solution standard de Winogradsky), sans azote, auquel sont ajoutées des doses variables de benzoate de sodium. Après stérilisation, ensemençer avec une souche d'*Azotobacter* récemment isolée du sol. La croissance est étudiée, par opacimétrie, au photomètre de Meunier, s'il n'y a pas noircissement du milieu ; dans le cas contraire, on procède par une numération directe. Le dosage de la substance noire est effectué par la méthode signalée dans notre note précédente (3).

En ce qui concerne la *croissance*, il existe une concentration minima (0,0001 g. par litre) au-dessous de laquelle il n'y a aucune prolifération, et optima (entre 0,1 g. et 1,5 g. par litre). Les concentrations supérieures sont moins favorables ; à 2 g. par litre la croissance est déjà diminuée et à 4,5 g. par litre elle est presque nulle (à noter que les formes d'invololution apparaissent au-dessus de 1 g. par litre).

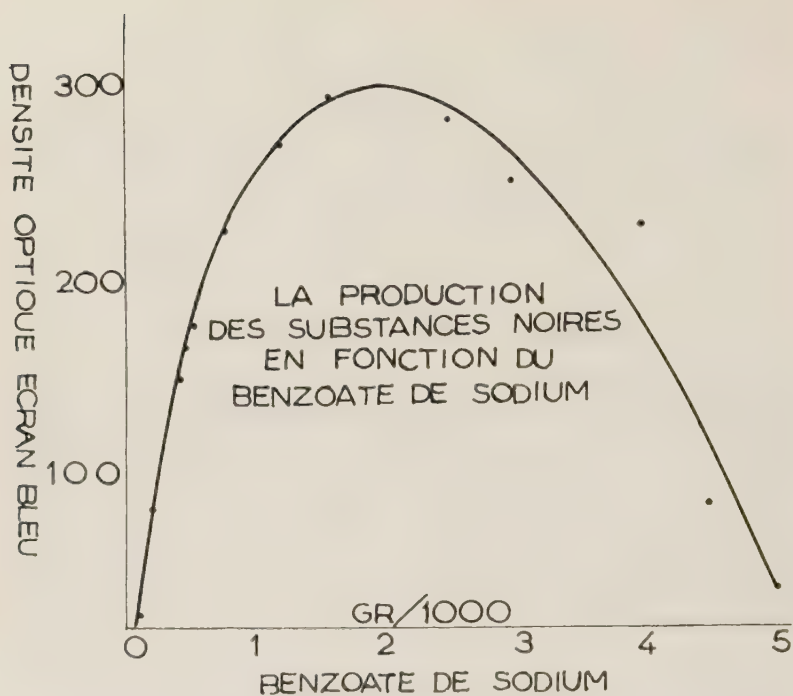
En ce qui concerne l'*activité de la benzoatase* (noircissement du milieu), la dose minima est de 0,1 g. par litre, l'optima à 2 g. Le noircissement est encore très appréciable à 3,5 g. par litre.

La courbe et le tableau suivants permettront de se faire une idée du phénomène.

(1) J. POCHON, Y. T. TCHAN et T. L. WANG, *C. R. Acad. Sci. (sous presse)*.
— Y. T. TCHAN, ces *Annales*, 1946, **72**, 689 et 826.

(2) E. C. SHOREY, *J. Agr. Res.*, 1914, 357-363.

(3) T. L. WANG et Y. T. TCHAN, ces *Annales*, 1948, **74**, 423.



DOSE de C_6H_5COONa (grammes par litre)	CROISSANCE	PRODUCTION de substances noires
0,00	—	19,5
0,001	±	19,5
0,05	+	19,5
0,10	++	30,0
0,20	++	81,5
0,40	+++	143,5
0,50	++++	170,5
0,70	+++++	218,5
1,00	+++++	255,5
1,20	+++	271,0
1,50	+++	290,5
2,00	+++	301,5
2,50	++	281,0
3,00	++	251,0
4,00	++	230,0
4,50	+	84,5
5,00	—	26,5

Il est intéressant de noter que, pour la croissance et le noircissement, il existe des concentrations minima qui sont dans le rapport de 1 (croissance) à 1.000 (formation de substance noire). La dose minima pour la croissance est retrouvée, pour ainsi dire, dans les expériences suivantes : dans une culture qui atteint sa croissance maxima (taux de croissance nul), il reste toujours une petite quantité de benzoate. Le seul facteur limitant est cependant la concentration insuffisante en benzoate, car il suffit d'en ajouter pour que la croissance reprenne.

Au point de vue de l'efficiencia géobiologique du phénomène, il faut remarquer que la concentration optima de 1 g. par litre pour la croissance est justement celle trouvée par Shorey dans le sol (1 g. par kilogramme de terre). A cette concentration, l'élaboration de substance noire, c'est-à-dire d'humus, est également possible. Si, comme il est logique, on fait abstraction de la fraction insoluble de la terre, la concentration efficiente de benzoate dans la fraction soluble peut atteindre des valeurs supérieures à 1 g. par kilogramme et se rapproche, par conséquent, de la concentration optima pour la formation de substance noire. Il ne semble pas que les doses inhibitrices (4 g. par kilogramme) puissent y être naturellement réalisées.

Les faits cités dans cette note concourent, avec ceux que nous avons antérieurement rapportés, à faire admettre, à côté de la fixation de l'azote, un deuxième processus géobiologique des *Azotobacter* : l'élaboration de substances humiques dans le sol, à partir des noyaux benzéniques.

(Institut Pasteur. Service de Microbie technique.)

ÉTUDE DE LA FORMOL-GÉLIFICATION DU SÉRUM PARALLÈLEMENT A LA RÉACTION AU THYMOL ET A LA SÉROLOGIE SYPHILITIQUE

par B. MAUPIN,

sous la direction de M. J. JULLIARD,

avec la collaboration de MM. P. H. BONNEL, H. PERROT, F. HENAFF,
R. ARDRY, R. CHARV, M. P. ROBERT.

Des travaux récents ont remis en honneur la réaction du formol-gel (1 et 2). Cette réaction n'a certes pas de valeur diagnostique [et l'on sait que l'opinion première de ses auteurs, Gaté et Papacostas (3), qui pensaient avoir découvert une réaction des sérums syphilitiques, n'a pu être confirmée]. Elle est en fait symptomatique d'une hyperglobulinémie (seuil fixé par de Vries à 37 g. p. 100), et plus exactement

(1) MILHAUD, Ch. PFISTER et J. LE COULTRE, *Helv. Med. Acta*, série A, 1949, 16, 110.

(2) G. MILHAUD, ces *Annales*, 1949, 77, 170.

(3) GATÉ et PAPACOSTAS, *C. R. Soc. Biol.*, 1920, 83, 1432.

d'un accroissement du sérum en γ -globuline [limite inférieure de positivité : 11,1 g. par litre, G. Milhaud (1)].

Appliquée au plasma, elle est en outre influencée par la teneur en fibrinogène. Mais dans le sérum, elle ne traduit que la teneur en γ -globulines, et c'est dans ce sens que l'on peut qualifier de spécifique la réaction du formol-gel.

Il nous a paru intéressant de présenter une courte statistique confrontant les données du formol-gel, de la réaction au thymol et des séro-réactions syphilitiques dans quelques centaines de cas.

TECHNIQUES. — 1° *Formol-gélification.* — Le sérum frais, clarifié par centrifugation, est réparti en 2 tubes qui reçoivent chacun 1 cm³ de sérum, puis 11 gouttes de formol du commerce (neutralisé au point de virage du méthyl-orange). Après agitation et bouchage, un tube demeure sur la table du laboratoire, l'autre est porté comme le conseille G. Milhaud (1) à l'étuve à 37°. Lecture après trois heures, seize heures, vingt-quatre heures, quarante-huit heures. On note comme positive une gélification franche au moins sur le tube à 37° et dans le délai de quarante-huit heures. La gélification à 37° est toujours plus précoce et plus complète qu'à la température du laboratoire (20° environ), ce qui conduit à une sensibilisation de la réaction [le seuil de γ -globulines pour le gel à + 37° s'abaisserait à 10 p. 1.000] (1).

La précocité des réactions peut se traduire par un système de notation tel que celui-ci :

Moins de 16 heures	+++
Moins de 24 heures	++
Moins de 48 heures	+

Au cas où l'on ne dispose que de 1 cm³ de sérum, la réaction à 37°, plus sensible, est seule pratiquée.

2° *Réaction au thymol* (Thymol Turbidity Test). — A 0,05 cm³ de sérum, nous ajoutons 3 cm³ d'une solution de thymol tamponnée à pH = 7,68. Après trente minutes à la température du laboratoire, la lecture s'opère à l'électrophotomètre de Vernes (écran Katathermic 7), en réglant le zéro sur un tube de solution de thymol, sans sérum. Nous suivons ainsi sensiblement les données de l'auteur [Cf. Mac Lagan (4)], le témoin au véronal sans thymol ne nous paraissant pas indispensable.

Nous considérons un sérum comme positif à partir de 20 unités photométriques.

Réactions au formol et réaction au thymol ont été exécutées et lues constamment par le même opérateur.

3° *Séro-réactions de la syphilis.* — Une réaction d'hémolyse sur sérum chauffé : Kolmer (antigène de l'Institut Pasteur).

Deux ou trois réactions de floculation (selon le cas) :

Meinicke-clarification (M K R II).

Kline (sur lame).

Kahn standard.

ORIGINE DES SÉRUMS. — Nous les répartissons en quatre catégories :

Les trois premières concernent des sérums d'Européens :

1° Syphilitiques : sujets, traités ou non, suivis dans les services de

(4) N. F. MAC LAGAN, *Brit. J. exp. Path.*, 1944, 25, n° 6.

Dermato-Vénéréologie des Hôpitaux militaires, et présentant au moins deux réactions du séro-diagnostic de la syphilis positives.

2° Ictériques ou suspects d'atteinte hépatique, à sérologie syphilitique négative (sujets en traitement dans les hôpitaux).

3° Présumés normaux (sérologie négative).

La quatrième catégorie groupe des sérums de Noirs africains que nous avons pu recueillir dans la région parisienne (sans discrimination de leur état pathologique).

Résultats : Ils s'expriment dans le tableau joint :

CATÉGORIE	FORMOL-GEL —		FORMOL-GEL +		TOTAL ET POURCENTAGE	
	Thymol —	Thymol +	Thymol —	Thymol +	des « formol-gels + »	des « thymol + »
<i>Européens :</i>						
Syphilitiques (traités ou non)	72	1	17	4	21 sur 94 soit 22,3 p. 100.	5 sur 94, soit 5,3 p. 100
Ictériques ou suspects d'atteinte hépatique. .	96	14	9	12	21 sur 131, soit 16 p. 100.	26 sur 131, soit 20 p. 100.
Présumés normaux. . .	97	1	2	0	2 sur 100, soit 2 p. 100.	1 sur 100, soit 1 p. 100.
<i>Noirs africains</i>	12	0	24	5	24 sur 41, soit 70,8 p. 100.	5 sur 41, soit 12,2 p. 100.

CONCLUSIONS. — Nous n'en tirerons pour le moment que deux conclusions :

1° D'une manière générale, il n'existe aucun parallélisme entre la réaction au thymol et celle du formol-gel, ce qui n'étonne pas puisque ces deux réactions obéissent à des déterminants différents. Il n'est pas rare que l'atteinte pathologique élève à la fois le taux des γ -globulines qui conditionnent le formol-gel, et celui des β -globulines, transportant des phospholipides, qui entrent en jeu dans la réaction au thymol ; il en résulte une positivité concomitante des 2 tests, qui apparaît plus fréquente chez les hépatiques.

Chez les syphilitiques, la proportion de 22,3 p. 100 de positivité au formol-gel n'est pas négligeable.

Il n'existe cependant aucun parallélisme entre les réactions utilisées dans le séro-diagnostic de la syphilis (5) et les deux précédentes.

(5) On sait que la réagine syphilitique a été localisée, suivant divers auteurs (J. A. COOPER, *Proc. Soc. exp. Biol. & Med.*, 1944, **57**, 248 ; B. D. DAVIS, D. H. MOORE, E. A. KABAT, Ad. KARRIS, *J. Immunol.*, 1945, **50**, 1) dans les γ -globulines et aussi dans un groupe de globulines intermédiaire entre les β et les γ -globulines.

2° Les Noirs africains présentent le phénomène de la formol-gélification dans la proportion extrêmement élevée des deux tiers des sérums soumis à notre examen.

Cette constatation, fruit d'une enquête récente effectuée au Laboratoire de Sérologie du Service central de Transfusion-Réanimation de l'Armée, rejoint celle de Beeson et Miller (6) ; ces auteurs ont relevé parmi les Noirs de Géorgie, du sexe masculin, une proportion de 5,6 p. 100 de positivité au formol-gel, contre 0,4 p. 100 chez les Blancs du même district. Ils attribuaient cette hyperglobulinémie non à la syphilis, mais à la lymphogranulomatose inguinale, fréquente chez les Noirs de cette région (7).

Dans les quelques cas où elle a pu être pratiquée, l'électrophorèse a confirmé l'élévation anormale du taux des globulines et surtout des γ -globulines des sérums de Noirs. Nous nous proposons de poursuivre cette étude en associant les données de l'analyse chimique et de l'électrophorèse à celles du formol-gel. Quelle qu'en soit l'origine (congénitale ou acquise), une teneur fréquemment élevée en γ -globulines de leurs sérums pourrait nous aider à comprendre les sérologies positives isolées, si fréquentes chez les Noirs d'Afrique (8).

(Service Central de Transfusion-Réanimation de l'Armée.)

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

Action combinée de l'antigène méthylique et de la streptomycine sur la tuberculose du cobaye et du lapin, par L. NÈGRE.

Nouvelles recherches sur les hémolysines microbiennes, par M. GUILLAUMIE et A. KRÉGUER.

Détermination des types de staphylocoques par l'agglutination, par P. MERCIER, J. PILLET et M^{me} P. CHABANIER.

Précisions sur la flore strepto-entérococcique, en particulier au cours de l'infection grippale saisonnière, par L. DUCHON.

(6) P. B. BEESON et E. S. MILLER, *Am. J. med. Sci.*, 1944, 207, 643.

(7) Il est vraisemblable que la méthode de formol-gélification utilisée par ces auteurs, qui ne donnent pas de détails techniques, était moins sensible que la nôtre. Précisons que la notation des seules réactions obtenues en vingt-quatre heures et à la température du laboratoire donne tout de même 36 p. 100 de positivité au formol.

(8) J. JULIARD, *Presse méd.*, 10 août 1946, 524.

Le Gérant : G. MASSON.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

EXTRAIT DES STATUTS :

Article premier. — L'association dite Association des Microbiologistes de Langue Française, fondée en 1937, à Paris, a pour but de grouper les Microbiologistes de langue française et de créer entre eux un lien. Elle a son siège à Paris.

L'association se compose de membres nationaux et de membres étrangers de toutes langues.

La langue française est la langue officielle des Congrès de l'Association et celle de la publication de ses travaux.

Art. 2. — L'A. M. L. F. est instituée uniquement pour l'étude et la discussion en commun de toutes les disciplines relevant de la science microbiologique.

Art. 3. — Les membres nationaux de l'A. M. L. F., ainsi que les membres étrangers résidant habituellement en France constituent la Section française de l'A. M. L. F. ou SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE. La Section française de l'A. M. L. F. reçoit dans l'intervalle des Congrès une délégation permanente du Conseil de l'A. M. L. F. Son activité est régie par un règlement intérieur, approuvé par l'Assemblée Générale.

Art. 4. — La Section française de l'A. M. L. F. ou SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE, constitue de plein droit la Section française de l'Association internationale de Microbiologie.

Art. 5. — Peut faire partie de l'Association toute personne remplissant une fonction scientifique dans un laboratoire de microbiologie (microbiologie pure ou appliquée, bactériologie, pathologie infectieuse, immunologie, sérologie, chimiothérapie, cancérologie), ou ayant publié des travaux scientifiques de microbiologie.

Art. 23. — *Publications* — Les publications des travaux exposés dans les séances mensuelles se font dans les conditions et selon les modalités décidées par le Bureau de la Section française.

Le Bureau peut refuser de publier tout travail ou communication, qui ne serait pas conforme aux buts de l'association ou au caractère de ses publications. Ses décisions sont sans recours.

Art. 27. — Les auteurs des communications et démonstrations devront être membres de l'Association. Les étrangers à l'Association ne seront acceptés comme auteurs que s'ils ont pour co-signataire un membre de l'Association, ou s'ils ont été invités par le Bureau à faire une communication, ou si un membre de l'Association ayant assisté aux recherches rapportées se charge de discuter le travail en séance.

En dehors des Congrès, dont la périodicité et la date sont fixées par l'Assemblée Générale sur la proposition du Bureau, l'Association se réunit en séances consacrées à des communications scientifiques, *le premier jeudi de chaque mois* (août et septembre exceptés), à 16 heures. Les séances ont lieu au Grand Amphithéâtre de l'Institut Pasteur ; elles sont publiques.

Les membres désirant présenter des communications sont priés d'en aviser le Secrétaire général, et de lui en communiquer le titre, pour permettre l'établissement de l'ordre du jour de la réunion.

Le texte des communications doit être remis à la séance, établi *ne varietur*, en exemplaire dactylographié original. La bibliographie

des auteurs cités sera établie, conformément aux règles admises par l'Association Internationale de Microbiologie, dans l'ordre suivant : nom de l'auteur, titre du périodique (en abrégé et en italiques), année de publication, tome (en chiffres arabes gras), page. Les signes t., p., etc., sont supprimés. Les abréviations des noms de périodiques courants figurent sur une liste qui sera adressée aux auteurs, sur leur demande. Les figures illustrant le texte doivent être remises avec leurs clichés typographiques, sinon il pourra en résulter des délais de publication. La Rédaction se charge, le cas échéant, de faire faire tous les dessins, graphiques, tracés, et de faire cliquer, aux frais des auteurs, tous les documents qui lui seront adressés à temps, soit huit jours au moins avant la séance, pour parution dans le numéro suivant des *Annales de l'Institut Pasteur*.

En raison des restrictions apportées aux publications par les circonstances actuelles, le texte de chaque communication ne pourra occuper plus de deux pages, de l'emplacement réservé dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, soit environ 1.200 mots. Les références bibliographiques et les clichés, s'il y en a, seront compris dans cet espace. Toute communication dépassant ce maximum sera retournée à son auteur, ou devra avoir été préalablement acceptée par la Rédaction des *Annales de l'Institut Pasteur*, pour y paraître en Mémoire.

Le Secrétaire général : P. LÉPINE.

Séance du 1^{er} Décembre 1949.

SOMMAIRE	Pages.
<i>Présentation d'ouvrage</i>	272
<i>Ouvrages reçus</i>	272
<i>Communications :</i>	
Etude de la première souche française de <i>Cl. botulinum D</i> , par A. R. PRÉVOT et E. R. BRYGOO	274
Quelques essais de transmission de la toxoplasmose par arthropodes piqueurs, par Georges BLANC, Jean BRUNEAU et Alain CHABAUD	277
Mise en évidence de l'allergie latente chez le cobaye, par J. VALTIS et F. van DEINSE	281
Réaction d'hémagglutination, type Dubos Middlebrook, réalisée avec une tuberculine purifiée. Résultats obtenus, par R. SOHIER (avec la collaboration de J. JUILLARD et I. TRIMBERGER)	283
Intradermo-réaction tuberculinique à l'aiguille. Résultats obtenus avec un instrument à pénétration automatique réglable, par R. SOHIER	286
Sur une souche atypique de bacille pesteux, par V. REYNES	288
Etude cytologique de <i>P. pestis</i> soumis à l'influence du bactériophage spécifique. — II. Etude de la cellule par la méthode de Robinow au violet cristal, par H. S. P'AN, Y. T. TCHAN et J. POCHON	291
Recherches sur les benzoatases des <i>Azotobacter</i> . — II. Influence de l'acide benzoïque sur la croissance et l'activité enzymatique, par T. L. WANG	293
Etude de la formol-gélification du sérum parallèlement à la réaction au thymol et à la sérologie syphilitique, par B. MAUPIN, sous la direction de M. J. JUILLARD, avec la collaboration de MM. P. H. BONNEL, H. PERROT, F. HENAFF, R. ARDRY, R. CHARY et M. P. ROBERT	295